

**PITKÄKESTOISEN LÄMPÖTILAN NOUSUN VAIKUTUS TRIPLOIDIEN  
KIRJOLOHIEN (*Oncorhynchus mykiss*) STRESSIVASTEGEENIEN  
ILMENTYMISTASOIHIN**

Lars Granlund  
Pro gradu -tutkielma  
Itä-Suomen yliopisto  
Biotieteiden koulutusohjelma/ Biotekniikan pääaine  
Helmikuu 2013

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta  
Biotieteiden koulutusohjelma, Biotekniikan pääaine  
LARS JOHAN GRANLUND: Pitkäkestoisen lämpötilan nousun vaikutus triploidien kirjolohien (*Oncorhynchus mykiss*) stressivastegeenien ilmentymistasoihin  
Pro gradu -tutkielma 49 sivua  
Ohjaajat: Juha Koskela (FT), Marjo Tuomainen (FT)  
Helmikuu 2013

---

Avainsanat: kirjolohi (*Oncorhynchus mykiss*), triploidia, lämpöstressi, *hsp30*, *hsp70*, *hsp90*

## TIIVISTELMÄ

Triploideja kaloja tuotetaan lähinnä niiden steriiliyden vuoksi. Steriilit kalat ovat vähemmän herkkiä lisääntymiskaudesta johtuville ongelmille kuten lihan laadun heikkenemiselle, taudeille ja kuolleisuuden kasvulle. Steriiliydestä on myös hyötyä viljeltyjen kalojen geneettisessä eristämisessä luonnonkannoista. Triploidien kalojen on kuitenkin havaittu olevan diploideja herkempiä stressille ja etenkin pitkäkestoinen lämpötilan nousu on lisännyt triploidien kalojen kuolleisuutta.

Tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia pitkäkestoisen lämpötilastressin vaikutusta triploidien ja diploidien kirjolohien (*Oncorhynchus mykiss*) selviytymiseen, kasvuun ja *hsp*-geenien (*hsp30*, *hsp70* ja *hsp90*) ilmentymiseen vähähappisessa ja korkeahappisessa vedessä. Erillisessä kokeessa selvitettiin diploidien ja triploidien kirjolohien stressigeenien ilmentymistä viileässä vedessä (Koe 1). Lämpöstressikokeessa triploideja ja diploideja kaloja kasvatettiin hapetetussa ja vähähappisessa + 20 °C vedessä (Koe 2). Molemmat kokeet kestivät 20 päivää ja niissä käytettiin kolmevuotiaita kirjolohia. Kalojen koon epätasaisuuden vuoksi koeryhmät jaettiin hyvin ja huonosti kasvaneisiin kokeissa tapahtuneen kasvun perusteella.

Kokeessa 1 huonosti kasvaneet diploidit kalat ilmensivät *hsp30*-geeniä enemmän kuin hyvin kasvaneet diploidit ( $p < 0.05$ ) ja kokeessa 2 happistressi lisäsi hyvin kasvaneiden diploidien kalojen *hsp90*-geenin ilmenemistä ( $p < 0.05$ ). Muita merkitseviä eroja *hsp*-geenien ilmenemisessä ei havaittu. Merkitsevien erojen puuttuminen on ongelmallista, koska ei ole varmaa aiheutettiinko kaloille kokeessa riittävää stressiä tai olivatko valitut *hsp*-geenit huonosti soveltuvia happistressin mittaamiseen. Kokeissa 1 ja 2 triploidien ja diploidien kalojen välillä ei havaittu eroja kuolleisuudessa, joten tulosten mukaan triploidien kalojen selviytyminen pitkäkestoisesta lämpöstressistä ei ole heikompaa kuin diploidien. Lisäksi kokeissa 1 ja 2 saatiin mielenkiintoinen tulos *hsp70*-geenin kahdesta eri mRNA-muodosta, mutta tuloksen syytä ei kyetty todentamaan.

Keywords: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), triploidy heat stress *hsp30*, *hsp70*, *hsp90*

## ABSTRACT

Triploid fish are mainly produced because of their sterility. Sterile fish are less susceptible to diseases and deterioration of meat quality that are related to the breeding season in diploid fish. Sterility also allows the genetic containment of farmed fish from the natural populations. However triploid fish are found to be more susceptible to stress and especially chronic high temperatures have increased their mortality.

The aim of this study was to compare the effects of chronic elevated temperatures and oxygen level on the survival and growth and on the expression of *hsp*-genes (*hsp30*, *hsp70* and *hsp90*) in triploid and diploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Expression of the *hsp*-genes in diploid and triploid fish in low water temperature (+10 °C) was studied in a separate experiment (Experiment 1). Heat stress was studied by growing triploid and diploid fish in +20 °C water under two different oxygen levels (Experiment 2). Both experiments lasted for 20 days and were conducted with three year old rainbow trouts. Due to the heterogeneity of the starting material the experimental groups were separated after the experiments to fast and slow growing fish according to their expected growth.

In experiment 1 the slow growing diploid fish expressed significantly less *hsp30* compared to fast growing diploid fish ( $p < 0.05$ ) and in experiment 2 hypoxia induced the expression of *hsp90* in the fast growing diploids. Other significant differences were not discovered and thus it is unclear if the stress was inadequate or if the *hsp*-genes were unsuitable indicators of hypoxia. In both experiments there were no differences in the survival of the triploid and diploid fish. In addition there was an interesting result that suggested there were two variants of the *hsp70* mRNA, but the cause of this remained unclear.

## **ESIPUHE**

Tämä pro gradu -tutkielma tehtiin Itä-Suomen Yliopiston Kuopion kampuksella vuosien 2010 ja 2013 välillä. Käytännön kokeet tehtiin Kuopion Yliopiston Kalantutkimusyksikössä ja Elintarviketurvallisuusviraston (Eviran) Kuopion toimipisteessä.

Haluan kiittää työn ohjaajia FT Juha Koskelaa ja FT Marjo Tuomaista kannustuksesta, pitkämielisyydestä ja avusta työn kirjoittamisessa. Erityiskiitoksen kannustuksesta sekä avusta työn suunnittelussa ja toteutuksessa haluan antaa FT Tiina Arsiolalle. Lisäksi haluan kiittää Kuopion yliopiston Kalantutkimusyksikön henkilökuntaa, FM Antti Nousiaista ja FM Lilli Frondeliusta avusta työn käytännön toteuttamisessa. Halua myös kiittää ELL Satu Viljamaa-Dirksiä mahdollisuudesta kasvattaa kaloja Eviran Kuopion toimipisteessä.

## LYHENNELUETTELO

2N = diploidi

3N = triploidi

4N = tetraploidi

°C<sub>min</sub> = celsiusasteminuutti

cDNA = lähetti RNA:sta käänteisesti kopioitu DNA

DNA = deoksiribonukleiinihappo

HL = huoneen lämpö

*hsp* = lämpöshokkiproteiini (heat shock protein)

kDa = kilodalton

MS-222 = trikaiini metyyli sulfonaatti

MPA = megapascal

N = haploidi

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> = natriumkarbonaatti

PBS = fosfaattipuskuroitu suolaliuos (phosphate buffered saline)

RNA = ribonukleiinihappo

mRNA = lähetti-RNA

SGR<sub>paino</sub> = painon suhteellinen päiväkasvu (special growth rate)

SGR<sub>pituus</sub> = pituuden suhteellinen päiväkasvu (special growth rate)

# SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO .....	8
2. KIRJALLISUUSKATSAUS .....	10
2.1 Kalojen polyploidia .....	10
2.1.1 Polyploidian esiintyminen luonnossa.....	10
2.1.2 Auto- ja allotriploidia.....	10
2.1.3 Triploidien kalojen tuottaminen.....	11
2.1.4 Triploidien kalojen tunnistaminen .....	13
2.2 Triploidian vaikutukset kalan fysiologiaan ja käyttäytymiseen.....	14
2.2.1 Suurentunut solukoko .....	14
2.2.2 Triploidian vaikutus lisääntymiseen .....	15
2.2.3 Käyttäytyminen .....	15
2.2.4 Epämuodostumat ja muut negatiiviset vaikutukset.....	16
2.3 Triploidian hyödyt kalanviljelyssä .....	17
2.3.1 Triploidian vaikutus kasvuun ja lihan laatuun .....	17
2.3.2 Geneettinen eristäminen triploidian avulla .....	18
2.4 Triploidien kalojen stressi ja lämmönsietokyky.....	19
2.4.1 Yleinen stressireaktio.....	19
2.4.2 Lämmönsietokyky.....	20
2.5 Triploidian vaikutus genetiikkaan .....	21
2.5.1 Triploidien kalojen geenien ilmentyminen .....	21
2.5.2 Hsp-proteiinit .....	22
3. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET .....	23
4. AINEISTO JA MENETELMÄT .....	23
4.1 Kalat .....	23
4.2 Koejärjestely.....	25
4.2.1 Kasvatusolosuhteet.....	25
4.2.1.2 Koe 1: Triploidien kirjolohien kuolleisuus ja <i>hsp</i> -geenien ilmentyminen viileässä vedessä .....	26
4.2.1.3 Koe 2: Lämpö- ja happistressin vaikutus triploidien kirjolohien kuolleisuuteen ja <i>hsp</i> -geenien ilmentymiseen.....	27
4.2.3 Näytteenotto .....	29
4.3 Laboratoriotyöt.....	29
4.3.1 RNA:n eristys ja DNAasi käsittely .....	29
4.3.2 Näytteiden yhdistäminen ja cDNA-synteesi .....	30
4.3.3 Kvantitatiivinen PCR .....	31
4.4 Kasvutulosten käsittely .....	32
4.5 Tilastolliset analyysit.....	33
5. TULOKSET .....	33
5.1 Triploidien ja diploidien kalojen kasvu ja ruumiinmuoto kokeissa 1 ja 2 .....	33
5.2 Koe 1: Triploidien kirjolohien kuolleisuus ja <i>hsp</i> -geenien ilmentyminen viileässä vedessä..	34
5.3 Koe 2: Lämpö- ja happistressin vaikutus triploidien kirjolohien kuolleisuuteen ja <i>hsp</i> -geenien ilmentymiseen .....	35
6. POHDINTA .....	38
6.1 Tutkimuksen tarkoitus.....	38
6.2 Kalat .....	38
6.3 Kirjolohien kasvu kokeen aikana .....	39
6.4 Koe 1: Triploidien kirjolohien kuolleisuus ja <i>hsp</i> -geenien ilmentyminen viileässä vedessä..	39
6.5 Koe 2: Lämpö- ja happistressin vaikutus triploidien kirjolohien kuolleisuuteen ja <i>hsp</i> -geenien ilmentymiseen .....	40

6.6 Yhteenveto .....	42
7. LÄHDELUETTELO .....	43

# 1. JOHDANTO

Polyploidian eli kromosomiston moninkertaistamisen mahdollisuuksia ja sovelluksia kalanviljelyn tarpeisiin on tutkittu 80-luvulta lähtien (esim. Utter ym. 1983; Benfey & Sutterlin 1984). Erityisen suurta kiinnostus on ollut steriilien triploidien (3N) kalojen tuottamiseen. Alun perin triploidian toivottiin lisäävän viljellyn kalan kasvunopeutta, sillä lisääntyneen DNA:n määrän vuoksi triploidit kalat ovat solukooltaan diploideja (2N) suurempia (Pandian & Koteeswaran, 1998). Vaikutukset kalojen kasvuun eivät kuitenkaan ole olleet yksiselitteisiä vaan triploidien kalojen kasvu on usein ollut diploideja heikompaa etenkin intensiivikasvatuksessa (Piferrer 2009). Triploideissa kaloissa on ajoittain esiintynyt suurempaa kuolleisuutta sillä ne ovat vaativampia kasvatusolosuhteistaan (Maxime 2008).

Tärkeimmät triploidian aiheuttamat muutokset kalassa ovat steriiliys, suurentunut solukoko ja muutokset alleelien suhteissa. Steriiliys on suora seuraus triploidien sukusolujen kykenemättömyydestä meioottiseen jakautumiseen. Suurien solujen toivottiin lisäävän kasvua, mutta niiden on epäilty aiheuttavan myös negatiivisia vaikutuksia, kuten solunsisäisten signaalireittien hidastumista tai epiteelien paksuuntumista (Piferrer ym. 2009). Muutokset genetiikassa johtuvat maternaalisen kromosomiston kertautumisesta. Maternaalisen kromosomiston kertautuminen suojaaa kalaa mutaatioiden vaikutuksilta vähentäen syöpiä ja se myös mahdollistaa lajiristeymien selviytymisen (Thorgaard ym. 1999; Blanck & Maunas 2005). Suurempi alleelien määrä voi kuitenkin myös lisätä ilmiöiden variaatiota ja siten heikentää diploideilla kaloilla saatuja jalostustuloksia (Johnson ym. 2007).

Nykyisin triploideista kaloista on kiinnostuttu lähinnä niiden steriiliyden vuoksi. Steriilit kalat ovat lisääntymiskyvyttömiä ja siksi ne ovat vähemmän herkkiä lisääntymiskauteen liittyville taudeille ja niiden tuotantoon ei tule lisääntymiskaudesta johtuvia katkoksia, jolloin diploidien lohikaloiden lihanlaatu on heikkoa ja myyntiin kelpaamatonta (Piferrer ym. 2009). Triploidit kalat eivät myöskään käytä energiaa sukurauhasten kasvattamiseen, siksi ne kasvavat paremmin diploidien kalojen saavutettua sukukypsyyden. Sukukypsyydestä on ongelmia etenkin diploideille koiraille, jotka saavuttavat sukukypsyyden pienempinä ja vaihtelevamman kokoisina kuin naaraat (Taranger ym. 2010). Yleisimpänä ratkaisuna tähän on täysnaarasparvien käyttäminen, vaikka naaraat kasvavat yleensä heikommin kuin koirat (Piferrer ym. 2009). Naaraiden käyttö ainoastaan viivyttaa sukukypsyyden saavuttamista ja triploidien kalojen kasvatuksesta on hyötyä, jos halutaan kasvattaa isompia kaloja ja samalla välttää sukukypsyydestä johtuvat ongelmat. Tästä johtuen



kalanviljelijät ovat kiinnostuneet triploidien kalojen käytöstä, vaikka ne ovat kasvatusolosuhteiltaan diploideja vaativampia (Maxime 2008). Lihan laadun ympärivuotisen tasaisuuden vuoksi myös jalostajat ovat kiinnostuneet triploidien kalojen käytöstä (Piferrer ym. 2009).

Steriiliydestä on myös hyötyä viljeltyjen kalojen geneettisessä eristämisessä luonnonkannoista. Viljeltyjä kaloja pääsee karkuun etenkin verkkokasseista ja niitä vapautetaan luontoon esim. virkistyskalastusta varten (Youngson ym. 2001). Luontoon karanneet tai vapautetut kalat voivat lisääntyä luonnonkantojen kanssa ja geneettisen materiaalin sekoittuminen voi heikentää alkuperäiskantojen perimän paikallisia sopeutumia. Koska kalojen karkaamista etenkin verkkokasvatusaltaista on lähes mahdotonta estää, triploidien kalojen viljely on lähes ainoa tapa eristää viljeltyt kalakannat geneettisesti luonnon kannoista. Triploidien kalojen käyttö mahdollistaa myös vieraslajien viljelyn alueilla, joilla niiden ei tahdota lisääntyvän luonnossa (Piferrer ym. 2009). Luonnonkantojen suojeleminen onkin yksi triploidian päähyödyistä ja esimerkiksi Iso-Britanniassa on vuonna 2015 tulossa voimaan säännös, jonka mukaan istutettavien laitoskantaan olevien järvitaimenten on oltava steriilejä triploideja täysnaarasparvia (Environment Agency 2009).

Triploidien kalojen on havaittu kestävän lämpötilastressiä diploideja heikommin (Ojolick ym. 1995; Piferrer ym. 2009). Lyhytkestoisen lämpötilan nousun ei ole yleensä havaittu huonontavan triploidien kalojen selviytymistä (Benfey ym. 1997; Galbreath ym. 2006), mutta pitkäkestoinen lämpötilastressi on tietyissä tilanteissa aiheuttanut triploidien kalojen kuolemia (Ojolick ym. 1995). Triploidien lohikalojen lämmönsietokykyä onkin tutkittu paljon (Ojolick ym. 1995; Benfey ym. 1997; Hyndman ym. 2003a; Galbreath ym. 2006, Atkins & Benfey 2008). On silti epäselvää miksi triploidit kalat eivät aina selviydy yhtä hyvin lämpötilastressistä. Lämpötilan noustessa veden happipitoisuus laskee, mutta samalla kalojen metabolia ja hapen kulutus kiihtyy. Triploidien kalojen diploideja korkeampi kuolleisuus voisi siis johtua diploideja heikommasta hapenottokyvystä. Optimaalisissa olosuhteissa triploidien kalojen on todettu kuitenkin menestyvän yhtä hyvin, tai ainakin lähes yhtä hyvin kuin diploidien (Maxime 2008; Piferrer ym. 2009).

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli verrata pitkäkestoisen lämpötilastressin vaikutusta triploidien ja diploidien kirjolohien (*Oncorhynchus mykiss*) selviytymiseen ja *hsp*-geenien ilmentymiseen vähähappisissa ja korkeahappisissa tilanteissa. Samalla selvitettiin triploidien ja diploidien kalojen *hsp*-geenien ilmenemistä viileässä vedessä.

## **2. KIRJALLISUUSKATSAUS**

### **2.1 Kalojen polyploidia**

#### **2.1.1 Polyploidian esiintyminen luonnossa**

Polyploidia määritellään yksilön kromosomistojen määrän kasvamiseksi suuremmaksi kuin lajilla yleensä tavataan (Piferrer ym. 2009). Sitä esiintyy yleisesti kasveilla ja kaloilla, mutta myös muilla selkärangkaisilla kuten matelijoilla ja yksittäistapauksissa jopa nisäkkäillä. Polyploidian ajatellaan olevan tärkeä tekijä kalojen evoluutiossa, ja sitä esiintyy monien kalalajien historiassa (Legatt & Iwama 2003). Kromosomiston kertaistumisen suurimpia hyötyjä evoluution kannalta on geneettisen monipuolisuuden lisääntyminen. Syyn polyploidiaan ajatellaan olevan mätimunien kehityshäiriöissä tai yllättävissä ympäristötekijöiden muutoksissa, jotka häiritsevät hedelmöittyneen mätimunän kehitystä (Legatt & Iwama 2003). Diploideilla yksilöillä mutaatiot eloonjäämisen kannalta tärkeissä alleeleissa voivat johtaa kehityshäiriöihin, jolloin näiden alleelien evoluutio on hidasta. Polyploidisilla yksilöillä suurempi alleelien määrä vähentää negatiivisten vaikutusten todennäköisyyttä. Lopulta alleelien toiminnot voivat erota toisistaan, koska useampaa eri alleelia ei yleensä tarvita yhden toiminnon tuottamiseen. Geenit ylimääräisissä alleeleissa siis muuttuvat lopulta joko toimintakyvyttömiksi tai ne saavat uuden tehtävän. Polyploidialla voi olla kuitenkin myös negatiivisia vaikutuksia, kuten elinten vähentynyt solumäärä, solujen koon liiallinen kasvu sekä häiriöt geenien säätelyssä, joten polyploidisten yksilöiden selviytymisen todennäköisyys riippuu hyötyjen ja haittojen suhteesta (Legatt & Iwama 2003; Piferrer ym. 2009). Kromosomistojen määrän lisääntyminen parittomalla määrällä tekee kaloista yleensä steriilejä, mutta silti tällaisiakin yksilöitä esiintyy luonnossa (Legatt & Iwama 2003). On kuitenkin olemassa kalalajeja, jotka pystyvät lisääntymään parittomasta kromosomistomäärästä huolimatta (Pala ym. 2008), tosin ne lisääntyvät usein suvuttomasti (Legatt & Iwama 2003).

#### **2.1.2 Auto- ja allotriploidia**

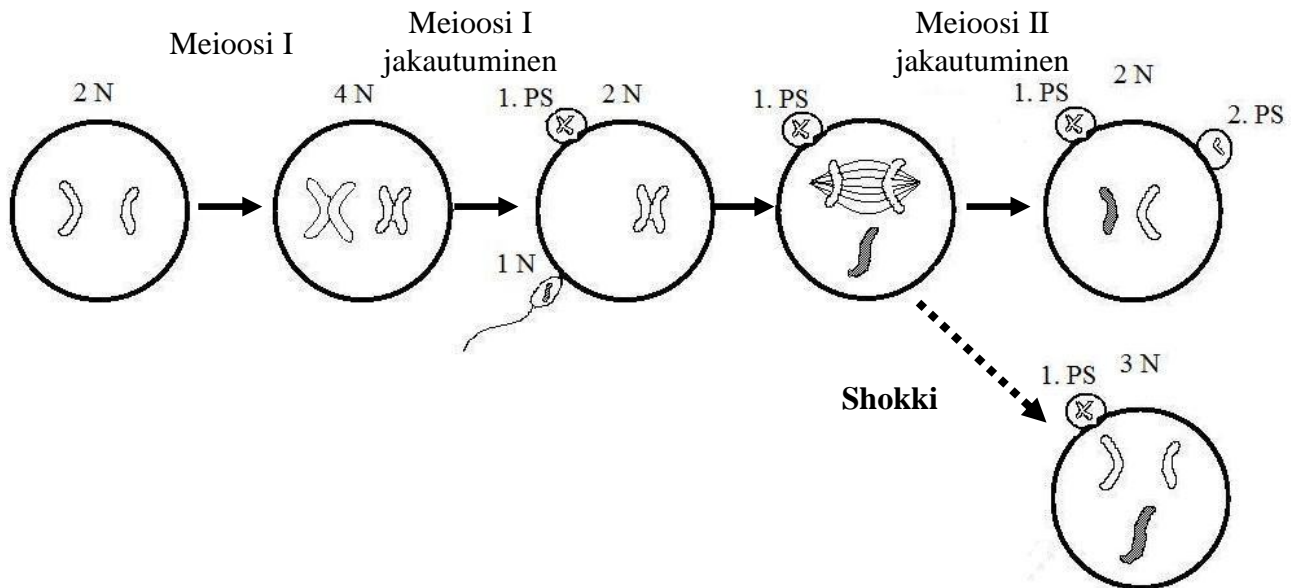
Polyploidia jaetaan autopolyploidiaan eli saman lajin sisällä tapahtuvaan kromosomistomäärän muutokseen tai allopolyploidiaan eli kahden eri lajin kromosomistojen yhdistymiseen (Legatt & Iwama 2003; Piferrer 2009). Autopolyploidisten lajien tuottamisesta on kiinnostuttu lähinnä

viljelykalojen sterilisoimiseksi, kun taas allopolyploidialla voidaan tuottaa lajiristeymiä mm. virkistyskalastuksen tarpeisiin (Blanck & Maunas 2005; Piferrer ym. 2009). Allopolyploidia mahdollistaa monia lajiristeymiä, jotka eivät olisi tavallisesti elinkelpoisia. Triploideilla lajiristeymillä on kaksi kromosomistoa toiselta emolajilta, mikä vakauttaa lajiristeymän alkiokehityksen jatkumisen. Risteytyskokeita on tehty paljon kirjolohella ja se on saatu risteytetymään taimenen (*Salmo trutta*), nieriän (*Salvenilus alpinus*), puronieriän (*Salvenilus fontinalis*) ja hopealohen (*Oncorhynchus kisutch*) kanssa (Chevassus ym. 1983; Blanck & Maunas 2005). Ongelmana on kuitenkin usein ollut suuri kuolleisuus jo kehityksen alkuvaiheissa, mutta alun kriittisten vaiheiden jälkeen kuolleisuus laskee huomattavasti (Blanck & Maunas 2005). Allopolyploidian lisähyötynä on se, että triploidit lajiristeymät on usein mahdollista erottaa emokaloista. Lisäksi tuotettujen kalojen triploidisaatio aste on 100 %, koska diploideiksi jääneet hybridit kuolevat. Kirjolohen ja taimenen hybridi on myös saanut positiivista palautetta virkistyskalastajilta kirjolohta aggressiivisemmän käytöksensä vuoksi (Blanck & Maunas 2005). Risteytetyjä lajeja viljellään jo jossain määrin esimerkiksi Ranskassa (Piferrer ym. 2009). Luonnossa esiintyvällä allopolyploidialla on merkitystä myös kalojen evoluutiossa, koska osa tiettyjen lajien risteymistä on lisääntymiskykyisiä (esim. Pala ym. 2008).

### **2.1.3 Triploidien kalojen tuottaminen**

Triploideja kaloja tuotetaan häiritsemällä hedelmöittyneen mätimunän normaalia kehitystä oikealla hetkellä ennen toisen poistosolun poistumista (Kuva 1) (Pandian & Koteeswaran 1998; Piferrer ym. 2009). Hedelmöittämätön munasolu on diploidi ja maternaalinen kromosomisto jakautuu toisen kerran meioottisesti vasta hedelmöityksen jälkeen. Oikealla hetkellä tehty shokki estää maternaalisten kromosomien erkanemisen toisistaan ja sitä seuraavan toisen poistosolun muodostumisen. Tällöin solu jää triploidiksi ja solun jatkaessa normaalia kehitystään siitä syntyvät tytärsolut ovat triploideja. Triploideilla kaloilla on siis kolminkertainen kromosomisto, jossa maternaalinen kromosomiluku on kaksinkertaistunut. Estämällä ensimmäinen solunjakautumien on mahdollista tuottaa tetraploideja kaloja, joiden kromosomisto on kaksinkertaistunut. Tetraploidien kalojen tuottaminen on yleensä vaikeaa ja niiden selviytyminen on heikkoa (Weber & Hostuttler 2012) Niistä ollaan kuitenkin kiinnostuneita, sillä risteyttämällä tetraploideja kaloja diploidien kalojen kanssa voidaan tuottaa triploideja kaloja ilman shokkikäsittelyä. Tetraploidit kalat ovat

lisääntymiskykyisiä, joten jos tetraploidien kalojen tuotannossa onnistuttaisiin, niiden avulla olisi helppo tuottaa suurissa määrin triploideja kaloja.



Kuva 1. Munasolut jakautuvat kerran meioottisesti muodostaen ensimmäisen poistosolun (1. PS) ja jäävät toisen meioosin metafaasiin ennen kuin ne vapautuvat naaraasta. Hedelmöittyminen käynnistää toisen meioottisen jakautumisen ja normaalissa tilanteessa toinen maternaalinen kromosomisto poistuu toiseen poistosoluun (2. PS). Solulle aiheutettu shokki kuitenkin estää toisen poistosolun muodostumisen, jolloin soluun jää triploidi kromosomisto. Maternaalinen kromosomisto (□), paternaalinen kromosomisto (■) (Piferrer ym 2009).

Polyploidisaation onnistumiseen vaikuttaa käytetty kalalaji, shokkiin käytetty menetelmä, shokin ajoittaminen sekä shokin intensiteetti ja kesto. Lämpö- ja kylmähokit ovat helppoja ja edullisia tapoja tuottaa polyploidisia kaloja (Benfey & Sutterlin 1984; Myers & Hershberger 1991; Felip ym. 1997; Peruzzi & Chatain 2000; Kalbassi ym. 2009), mutta paineshokilla saadaan yleensä parempia tuloksia (Benfey & Sutterlin 1984; Malison ym. 1993; Gillet ym. 2001; Linhart ym. 2001; Peruzzi & Chatain 2000; Peruzzi ym. 2004; Xu ym. 2008). Kylmähokit, joissa munasolut altistetaan hetkellisesti matalalle lämpötilalle (esimerkiksi 0-4 °C, 10 min), soveltuvat parhaiten lämpimänvedenkaloille, mutta kylmänvedenkaloille kuten kirjolohelle käytetään lämpöshokkia, jossa hedelmöitetty munasolut altistetaan lyhytaikaisesti korkeammalle lämpötilalle (esimerkiksi 10-25 min, 24-32 °C) (Pandian & Koteeswaran 1998; Piferrer ym. 2009). Paineshokissa hedelmöitetty mätimunat altistetaan lyhytaikaisesti n. 62 MPa:n paineelle (Piferrer ym. 2009).

Paineshokin avulla voidaan tuottaa täysin triploideja parvia kaupallisessa mittakaavassa ja tulokset ovat toistettavia (Piferrer ym. 2009). Lisäämällä shokkien intensiteettiä ja kestoja saadaan yleensä suurempi prosentuaalinen polyploidian aste, mutta samalla kuolleisuus kasvaa (Pandian & Koteeswaran 1998).

Tärkein yksittäinen polyploidisaation onnistumiseen vaikuttava tekijä on shokin ajoittaminen hedelmöityksen jälkeen (Pandian & Koteeswaran 1998; Piferrer ym. 2009). Koska mätimunien kehittymisnopeus hedelmöityksen jälkeen riippuu veden lämpötilasta, shokin aloitusajankohta ilmoitetaan yleensä asteminuutteina (°Cmin). Triploidien lohikalojen tuottamiseksi shokin oikea aloitusaika on n. 150-300 °Cmin hedelmöityksen jälkeen. Mätimunien kehityksnopeudessa hedelmöityksen jälkeen on laji- ja kantakohtaisia eroja ja siksi pienetkin muutokset shokin aloitusajassa voivat vaikuttaa käsittelyn tehokkuuteen (Weber & Hostuttler 2012).

Tetraploidien kalojen tuotto on huomattavasti vaikeampaa kuin triploidien. Ongelmat tetraploidien kalojen tuotannossa johtuvat mm. shokin ajoittamisen vaikeudesta, kalojen suuresta kuolleisuudesta ja kannan ylläpidon vaikeudesta (Hershberger & Hostuttler 2005; Weber & Hostuttler 2012). Myös triploidien kalojen tuottamisessa tetraploidien kalojen avulla on ollut ongelmia, sillä tetraploidien kalojen siittiöt ovat liian isoja hedelmöittääkseen tehokkaasti diploidien kalojen munasoluja, jolloin hedelmöitystulokset jäävät heikoiksi (Chourrout ym. 1986; Meyers & Herzberger 1991). Parempia tuloksia voisi saada valikoimalla koiraita, jotka tuottavat pieniä siittiöitä. Ongelmista huolimatta Weber & Hostuttler (2012) onnistuivat kasvattamaan tetraploideja kirjolohia useassa sukupolvessa. Risteyttämällä tuotetut toisen sukupolven tetraploidit naaraat selviytyivät paremmin ja tuottivat huomattavasti parempaa mätää kuin shokkikäsittelyllä tuotetut ensimmäisen sukupolven naaraat. Tetraploidien kalojen ongelmana on myös mosaikismi, jossa osa kalan soluista on diploideja ja osa tetraploideja. Mosaikismi voi johtaa siihen, että polyploidiselta analyysissä näytävällä kalalla onkin diploidin kalan sukuoluja. Triploideilla kaloilla ei ole havaittu mosaikismia ja syy tetraploidien kalojen mosaikismiin johtuu luultavasti tetraploidisaation erilaisesta indusoitumistavasta (Zhang & Onazato 2004).

#### **2.1.4 Triploidien kalojen tunnistaminen**

Triploidit kalat eivät ulkoisesti eroa diploideista kaloista, joten ne on erotettava toisistaan muilla menetelmillä (Maxime 2008). Triploidien kalojen solun DNA-määrä on 1,5-kertainen ja siksi niiden

solut ovat suurempia. Polyploidian vaikutus solun kokoon on suurempaa pienissä soluissa, joiden tilavuudesta tumalla on merkittävä osuus, kuten esimerkiksi punasoluissa (Kalbassi ym. 2009), mutta pienempää suurissa soluissa kuten lihassoluissa (Johnston ym. 1999). Yksinkertaisin menetelmä, jolla triploidit kalat voidaan erottaa diploideista, on mitata punasolujen tumen halkaisija verisivelistä. Toinen, mutta huomattavasti työläämpi vaihtoehto on kromosomien laskeminen (Pandian & Koteeswaran 1998). Nykyisin paljon käytetty menetelmä on virtaussytometria, joka perustuu DNA:han sitoutuvaan fluoresoivaan merkkiaineeseen ja jonka avulla voidaan määrittää DNA:n määrä yksittäisessä solussa (Allen 1983). Näyte otetaan kaloilla yleensä verestä, mutta määrittystä on tehty myös mm. evä-, lihas- tai mätimunasonäytteestä (Lecommandeur 1994; Lamatsch ym. 2000). Virtaussytometria on nopea tapa selvittää polyploidiaa, sillä se mahdollistaa satojen yksilöiden käsittelyn päivässä (Thorgaard ym. 1982; Allen 1983; Piferrer ym. 2009). Vaikka nykyisillä menetelmillä pystytään tuottamaan toistettavasti 100 % triploideja parvia, kalojen triploidia on todennettava ennen myyntiä. Tämän vuoksi paras menetelmä tuottajan kannalta olisi mätimunasta tehtävä analyysi, jolloin kaloja ei tarvitse kasvattaa näytteenottokelpoisuuteen saakka. Etenkin viljeltäessä vieraslajeja tai geenimuunneltuja kaloja on varmistettava jokaisen kalan steriiliys luotettavasti. Piferrer ym. (2009) ehdottavatkin sellaisten triploidien lajien kehittämistä, jotka voisi helposti tunnistaa triploideiksi ulkonäön (esimerkiksi värityksen) perusteella.

## **2.2 Triploidian vaikutukset kalan fysiologiaan ja käyttäytymiseen**

### **2.2.1 Suurentunut solukoko**

Merkittävä triploidisaation aiheuttama muutos kalassa on suurentunut solukoko, joka on seurausta tumen ja soluliman kokosuhteen pysymisestä samana (Pandian & Koteeswaran 1998). Triploidien kalojen solujen koon kasvu ei ole kuitenkaan johtanut triploidien kalojen huomattavasti suurempaa kokoon. Tästä seuraa se, että verrattuna diploideihin kaloihin triploidien kalojen elimet ovat muodostuneet pienemmästä määrästä soluja. Esimerkiksi triploidien kalojen veressä on vähemmän punasoluja tilavuutta kohti ja lihas muodostuu pienemmästä määrästä isoja soluja (Johnston ym. 1999). On mahdollista, että suurentunut soluliman tilavuus voisi heikentää/hidastaa signaalireittien toimintaa tai muuta solun perustoimintaa, mutta selvää näyttöä tästä ei ole (Piferrer ym. 2009). Ilmeisesti suurempikokoiset solut pystyvätkin kompensoimaan vähentyneitä solumääriä ja

esimerkiksi hapenkuljetuskyky vaikuttaa olevan samanlainen sekä triploideilla että diploideilla kaloilla (Sadler ym. 2000a).

### **2.2.2 Triploidian vaikutus lisääntymiseen**

Triploidian vaikutus naaraiden sukurauhasten kehittymiseen on huomattavasti suurempaa kuin triploidian vaikutus koiraiden sukurauhasiin (esim. Peruzzi ym 2004). Triploidien naaraiden sukurauhaset eivät kehity juuri ollenkaan, sillä naaraiden sukusolujen meioosi pysähtyy jo alkuvaiheissa (Felip ym. 2001b). Kehittymättömät sukurauhaset eivät eritä hormoneita ja triploidien naaraiden estradioli-17 $\beta$  ja testosteronitasot jäävät alhaisiksi (Tiwary ym. 2004). Triploidien koiraiden siittiöt kehittyvät pidemmälle ja ne käyvät läpi meioosin ensimmäisen jakautumisen, mutta suurin osa ei pysty käymään läpi meioosin toista jakautumista (Felip ym. 2001b). Jotkut kalalajit pystyvät tuottamaan hedelmöityskykyisiä siittiöitä triploidiasta huolimatta, mutta se on harvinaista ja lohikaloilla tätä ilmiötä ei ole havaittu (Piferrer ym. 2009). Johtuen siittiöiden kehityksestä koiraiden gonadit kasvavat, mutta jäävät usein pienemmiksi kuin diploideilla koirilla (Felip ym. 2001b). Osittain kehittyneet gonadit kuitenkin erittävät hormoneja ja triploidit koiraat vastaavat hormonaalisesti diploideja (Piferrer ym. 2009).

### **2.2.3 Käyttäytyminen**

Triploidia vaikuttaa myös käyttäytymiseen, esimerkiksi triploidit lohikalat eivät palaa yhtä usein makeaan veteen lisääntymistä varten, eivätkä siten kilpaile resursseista diploidien kalojen kanssa (Cotter ym. 1999). Etenkin triploidien naaraslohien (*Salmo salar*) nousu jokiin on harvinaista, johtuen luultavasti niiden hormonaalisista eroista diploideihin naaraisiin (Felip ym. 2001b, Yongson ym. 2001). Triploidit koiraat vastaavat hormonaalisesti diploideja koiraita ja voivat esittää lisääntymiskäyttäytymistä. Ne saattavatkin nousta jokiin ja yrittää lisääntyä diploidien naaraiden kanssa, mutta jättävät mädin hedelmöittämättä. Tästä johtuen on ehdotettu, että tietyissä tilanteissa triploideja koiraita voitaisiin käyttää jonkin vieraslajin hävittämiseen tietyltä alueelta (Piferrer ym. 2009).

Triploideja kaloja pidetään myös vähemmän aggressiivisina kuin diploideja (O'Keefe & Benfey 1997; Garner ym. 2008). Ero aggressiivisuudessa näkyy ruokintatilanteissa ja sitä on käytetty

selittämään triploidien kalojen heikompaa kasvua yhteiskasvatuksessa diploidien kalojen kanssa. Eroa aggressiivisuudessa voi selittää myös se, että triploidien lohien aivojen rakenne eroaa diploidien lohien aivoista (Frazer ym. 2012b). Tutkimuksen mukaan triploideilla lohilla on kalan kokoon suhteutettuna yhtä suuret aivot kuin diploideilla, mutta niiden etuaivot ja pikkuaivot ovat diploideja suuremmat. Toisaalta diploidien kalojen hajukäämit olivat suuremmat. Tulos on yllättävä, sillä pikkuaivojen ja etuaivojen suurempi koko on yhdistetty aggressioon ja aktiiviseen saalistukseen. On kuitenkin mahdollista, että triploidit kalat joutuvat käyttämään enemmän aikaa saalistamiseen ja siksi niiden aivot kehittyvät erilaisiksi. Erilainen saalistuskäyttäytyminen voisi myös selittää miksi triploidit kalat pärjäävät heikommin luonnonoloissa, sillä ruoan etsiminen altistaa kalan myös saalistukselle (Frazer ym. 2012a).

## **2.2.4 Epämuodostumat ja muut negatiiviset vaikutukset**

Triploidiaan on ajoittain liitetty negatiivisia vaikutuksia, kuten epämuodostumia. Triploideilla lohilla on todettu alaleuan ja selkärangan epämuodostumia sekä muutoksia kidusten pinta-alassa (Sadler ym. 2001; Fjellidal & Hansen 2010; Leclercq 2011). Sadler ym. (2001) kokeessa tasmanialaista kantaa olevien triploidien lohien kidusten pinta-ala oli selvästi pienentynyt ja kaloilla oli alaleuan epämuodostumia, mutta toisaalta myös diploidissa kalakannassa oli normaalia enemmän epämuodostumia. Toisaalta Leclercq ym. (2010) tutkimuksessa skotlantilaista kantaa olevien triploidien lohien kidusten pinta-ala ei eronnut diploideista, mutta triploideilla kaloilla oli selkärangan epämuodostumia ja kaihia. Irlantilaisessa lohikannassa ainoa triploidiaan liitetty epämuodostuma oli kaihi (Cotter ym. 2002). Norjalaisilla lohilla jatkuvassa valaistuksessa kasvatetuilla diploideilla kaloilla oli vähemmän kaihia, mutta eroa ei havaittu luonnonvalorytmissä, eikä triploidiaan liitetty muita haittavaikutuksia (Oppedal ym. 2003). Triploidian aiheuttamat epämuodostumat näyttävätkin riippuvan käytetystä kalakannasta. Syy tähän voi olla siinä, että triploidia lisää geneettistä monimuotoisuutta, jolloin kannassa piilevät ominaisuudet pääsevät voimakkaammin esille (Sadler ym. 2001; Johnson ym. 2007). Toisaalta tetraploideja ja diploideja kirjolohia risteyttämällä tuotetuissa triploideissa kirjolohissa ei havaittu epämuodostumia (Myers & Herzberger 1991). Kaikki triploidien ja diploidien kalojen väliset erot eivät siis välttämättä johdu polyploidisaatiosta. Triploidian aiheuttamien haittojen on myös todettu olevan osittain riippuvia käytetystä shokkimenetelmästä (Piferrer ym. 2009), ja shokkikäsiteltyjen triploidien kalojen on todettu kasvavan huonommin kuin risteyttämällä tuotettujen triploidien (Malison ym. 1993). Lähes kaikki triploidien kalojen tutkimus on tehty vertaamalla shokkikäsiteltyjä triploideja kaloja



shokkikäsittelemättömiin diploideihin kaloihin, joten osa havaituista eroista voi johtua shokin mahdollisesti aiheuttamista haitoista. Siten erot käytetyssä shokkimenetelmässä tai sen optimoinnissa voivat johtaa ristiriitaisiin tuloksiin eri tutkimusten välillä.

## **2.3 Triploidian hyödyt kalanviljelyssä**

### **2.3.1 Triploidian vaikutus kasvuun ja lihan laatuun**

Triploidian vaikutusta kasvuun on tutkittu paljon, mutta tutkimustulokset ovat osittain ristiriitaisia. Osassa tutkimuksista triploidian on havaittu lisäävän kasvua (Oppedal ym. 2003; Leclercq ym. 2011; Taylor ym. 2011), osassa sen on havaittu heikentävän kasvua (Galbreath ym. 1994; Galbreath & Thorgaard 1995; Whitler ym. 1995; Bonnet ym. 1999; Friars ym. 2001; Shrimpton ym. 2007) ja osassa triploidialla ei ole havaittu olevan merkittävää vaikutusta (Hussain ym. 1995; Keefe & Benfey 1999; Whitler ym 1999; Felip ym. 2001b; Cotter ym. 2002). Vertailemalla tuloksia voidaan todeta, että optimaalisissa oloissa kasvatetuilla triploideilla kaloilla kasvunopeudessa ei ole suurta eroa diploideihin ennen sukukypsyuden saavuttamista. Diploidien kalojen saavutettua sukukypsyuden triploidit kalat kuitenkin kasvavat nopeammin, koska ne eivät käytä energiaa sulusolujen tuottamiseen (esim. Oppedal ym. 2003). Tutkimustuloksiin voi myös vaikuttaa triploidian indusointiin käytetty shokki (esim. Malison ym. 1993) ja se onko triploidit kasvatettu erillään diploideista, koska triploidit kalat kasvavat yleensä huonommin kuin diploidit jos niitä kasvatetaan yhdessä (esim. Maxime 2008). On kuitenkin selvää, etteivät triploidian päähyödyt ole diploideja kaloja paremmassa kasvussa.

Kalanviljelyn kannalta on myös tärkeää miten triploidia vaikuttaa lihan laatuun. Sukukypsyuden saavutettuaan diploidit kalat käyttävät energiaa sulusolujen kehitykseen, mikä heikentää kalan kasvua, lihan laatua ja altistaa kalan sairauksille (Piferrer ym. 2009). Diploideilla kirjolohilla lihan laadun heikkeneminen lisääntymiskaudella voi johtaa tuotannon katkoksiin suurikokoisia kaloja tuottaessa. Tätä ongelmaa triploideilla kaloilla ei ole. Triploidien kalojen lihassa on vähemmän satelliittisoluja, jotka kykenisivät uusien lihassäikeiden synnyttämiseen (Johnston ym. 1999). Triploidien kalojen lihassolut ovat kuitenkin suurempia, joten se kompensoi satelliittisolujen määrästä johtuvaa eroa. Triploidien kalojen lihan on todettu joissain kokeissa olevan hiukan

rasvaisempaa ja sisältävän vähemmän vettä kuin diploidien (Peruzzi ym. 2004; Segato ym. 2006; Poontawee ym. 2007). Erot lihan laadussa lisääntymiskauden ulkopuolella ovat kuitenkin olleet pieniä. Triploidien kalojen lihanlaatu on kuitenkin tasaisempaa kuin diploidien ja siksi se on saanut jalostajien arvostusta. Esimerkiksi Ranskassa savustetun kirjolohifileen korkein laatumerkintä ("Label Rouge") annetaan vain triploideista kaloista peräisin olevalle fileelle (Piferrer ym. 2009).

### **2.3.2 Geneettinen eristäminen triploidian avulla**

Istutetut tai karanneet laitoskasvatetut kalat saattavat heikentää luonnonkalakantojen selviytymistä, kilpailemalla niiden kanssa ravinnosta tai lisääntymällä niiden kanssa (Youngson ym. 2001). Luonnonpopulaatiot ovat geneettisesti sopeutuneita tietyille alueille ja eri joissa kutevat lohikalakannat eivät juuri lisäänty toistensa kanssa. Viljeltyt kalat ovat puolestaan geneettisesti sopeutuneita viljelyoloihin ja saattavat siten risteytyessään luonnonkantojen kanssa heikentää niiden perimää vähentämällä paikallisia sopeumia. Viljeltyjen kalojen karkaaminen esimerkiksi kassikasvatuksesta on kuitenkin yleistä ja luonnonkalakannat ovat yleisesti osittain sekoittuneita kasvatettujen kalojen kanssa (Youngson ym. 2001; Morris ym. 2008). Koska triploidit kalat ovat steriilejä, karatessaan viljelylaitoksilta ne eivät uhkaa luonnonkantojen geneettistä perimää.

Triploidiasta voi olla myös hyötyä muuntogeenisten kalojen eristämisessä luonnonkannoista. Geenimuuntelulla voidaan esimerkiksi lisätä kalojen kasvunopeutta (Devlin ym. 2006). Seeprakaloista on puolestaan tehty pimeässä hehkuvia fluoresoivien proteiinien avulla (Gong ym. 2001). Hehkuvia GloFish<sup>TM</sup> -kaloja on Yhdysvalloissa myynnissä akvaarioharrastajille (Snekser ym. 2006). Muuntogeenisten kalojen tutkimus on ollut jo pitkään nousussa, mutta kaupallisten sovellusten esteenä on usein pelko geenimuunneltujen yksilöiden lisääntymisestä luonnossa. Geenimuunneltujen kalojen karkaamisen estäminen voi olla vaikeaa ja niiden lisääntymisen estämiseksi on kehitteillä useita tapoja (Wong & Eennenam 2008). Tällä hetkellä paras tapa kalojen steriloinniksi on triploidia. Ongelmana on kuitenkin mahdollisuus, että osa shokkikäsitellyistä kaloista jää diploideiksi. Yksikin lisääntymiskykyinen muuntogeeninen kala voisi karatessaan levittää siirtogeenisen ominaisuuden luonnonkantoihin. Yhdysvalloissa tehtiin ensimmäinen lupahakemus kasvuhormoni-siirtogeenisen lohen kaupalliseen viljelyyn vuonna 1996, mutta se ei ole saanut hyväksyntää luultavasti siksi, ettei 100 % triploidian tasoon luoteta (Piferrer ym. 2009) On myös muutamia esimerkkejä kalalajeista, jotka ovat lisääntyneet triploidiasta huolimatta (Arai ym. 2001).

## 2.4 Triploidien kalojen stressi ja lämmönsietokyky

### 2.4.1 Yleinen stressireaktio

Kaloille stressiä aiheuttavat tekijät voidaan jakaa bioottisiin, kuten saalistajat ja taudit, ja abioottisiin, kuten veden laatu ja lämpötila. Kalat reagoivat stressiin kuten muutkin selkärangaiset pyrkien palauttamaan tasapainon yleisen stressireaktion avulla (Iwama ym. 2004; Roberts ym. 2010). Stressivasteeseen liittyy hormonaalisia ja solutason vasteita sekä muutoksia käyttäytymisessä. Perinteisten stressin voimakkuutta kuvaavien indikaattoreiden (esim. kortisoli) käyttämisessä ongelmina ovat kalojen käsittelyn ja näytteenoton vaikutukset arvoihin (Roberts ym. 2010). Näytteenotto ja kalojen nukuttaminen/lopettaminen ovat aina stressaavia tilanteita ja niiden aiheuttamat vaikutukset voivat peittää alleen tutkittavan tekijän aiheuttamat muutokset.

Triploidien kalojen selviytyminen viljelyolosuhteissa on ollut usein heikompaa kuin diploidien ja etenkin meriveteen siirtäminen ja pitkäkestoinen lämpötilan nousu ovat aiheuttaneet triploidien kalojen kuolemia (Galbreath & Thorgaard 1995; Ojolick ym. 1995). Kaikissa kokeissa eroa kuolleisuudessa ei ole kuitenkaan havaittu (Hyndman 2003a; Leclercq 2011). Yhtä ainoaa selittävää tekijää triploidien huonompaan selviytymiseen ei ole löydetty. Triploidien kalojen stressivasteita liittyen meriveteen siirtoon, eristämiseen, kuljetukseen ja liikuntaan ovat tutkineet mm. Benfey & Biron (2000), Hyndman ym. (2003a,b), Sadler ym. (2000 a,b), Taylor ym. (2007) ja Legatt ym. (2011). Tutkimusten lähtökohtana on ollut selvittää stressin vaikutusta triploidien kalojen kuolleisuuteen viljelyoloissa. Erojen kuolleisuudessa on odotettu johtuvan lähinnä triploidien kalojen suurentuneesta solukoosta ja elinten vähäisemmästä solumäärästä, mutta niiden vaikutusta ei ole voitu todistaa. Samalla triploidien ja diploidien kalojen stressivasteissa ei ole juurikaan havaittu eroja (Taylor ym. 2007). Myös tautivasteita tutkittaessa erot ploidiatasojen välillä ovat olleet pieniä (Langston ym. 2001; Budiño ym. 2006).

On epäselvää miksi triploidit kalat sietävät koeolosuhteissa monenlaisia stressitekijöitä yhtä hyvin tai lähes yhtä hyvin kuin diploidit, mutta intensiivikasvatuksessa triploidien kalojen kuolleisuus on suurempaa (Piferrer ym. 2009). Tilanteet, joissa on useita eri stressitekijöitä, ovat mahdollisesti haastavampia triploideille kaloille. Lisäksi monet kokeet ovat olleet lyhytkestoisia, jolloin kaikki erot eivät ole välttämättä päässeet esille. Triploidien kalojen viljelyssä onkin siis kiinnitettävä diploideja enemmän huomiota viljelyolosuhteisiin (Maxime 2008).

## 2.4.2 Lämmönsietokyky

Triploidien lohikalojen lämmönsietokykyä on tutkittu paljon (esim. Ojolick ym. 1995; Galbreath ym. 2006; Atkins & Benfey 2008), koska lämpimät kesät ovat ajoittain aiheuttaneet triploidien kalojen kuolleisuuden kasvua. Tutkimustulokset lämpötilan vaikutuksesta ovat kuitenkin ristiriitaisia. Triploidien ja diploidien kalojen vasteessa hetkelliseen lämpötilan nousuun ei ole havaittu eroa (esim. Galbreath 2006), mutta Ojolick ym. (1995) havaitsivat kirjolohelle tehdyssä kokeessa, että pitkäkestoinen korkea lämpötila (21 °C, 57 päivää) lisäsi triploidien kalojen kuolleisuutta. Hyndman ym. (2003a) tutkivat puronierän selviytymistä uuvuttavasta liikuntastressistä kuukauden kestäneen lämpöstressin (19 °C) jälkeen. Kuukauden lämpimän veden jakson aikana yksikään kaloista ei kuollut, mutta uuvuttavan liikuntastressin jälkeen kymmenestä triploidista kalasta kuoli yhdeksän. Kaikki diploidit kalat kuitenkin selviytyivät kokeesta. Triploidien ja diploidien kalojen kuolleisuudessa ei havaittu eroa, kun samantyyppinen koe tehtiin viileässä (9 °C) vedessä (Hyndman ym. 2003b). Selkeää syytä triploidien kalojen korkeampaan kuolleisuuteen lämpöstressiä seuranneessa liikunnassa ei löydetty, mutta sen epäiltiin johtuvan usean eri stressitekijän kasautumisesta (Hyndman ym. 2003a, 2003b)

Triploidien kalojen diploideja suurempi kuolleisuus lämpimissä vesissä voi johtua kykenemättömyydestä sopeutua kasvaneeseen hapen tarpeeseen (Ojolick ym. 1995). Lämpötilan nousu vähentää liukoisen hapen määrää vedessä ja samalla kiihdyttää kalan metaboliaa. Optimaalisessa lämpötilassa (+15 °C) triploidien ja diploidien lohien veren hapensitomiskyvyssä ei kuitenkaan ole havaittu merkitsevää eroa (Sadler ym. 2000). Näyttääkin siltä, että ainakin hyvissä olosuhteissa triploidien kalojen suuremmat punasolut pystyvät kompensoimaan pienemmän lukumääränsä suuremmalla yksittäisen solun hemoglobiinimäärällä. Atkins & Benfey (2008) mukaan triploidien lohien ja puronieriöiden (*Salvenius fontinalis*) hapen kulutuksesta mitattu perusmetabolian taso saavuttaa maksiminsa alhaisemmissa lämpötiloissa kuin diploidien. Hieman koholla olleissa lämpötiloissa (lohi: 12 °C ja 15 °C, taimen: 9 °C ja 12 °C) perusmetabolian taso oli triploideilla kaloilla korkeampi kuin diploideilla, mutta korkeammassa lämpötilassa (lohi 18 °C, taimen 15 °C) triploidien metabolian taso oli alle diploidien vastaavan. Koska kalojen metabolian tason odotetaan nousevan lämpötilan noustessa, on mahdollista, että triploidien kalojen lämpötilaoptimi on matalampi kuin diploidien.

## 2.5 Triploidian vaikutus genetiikkaan

### 2.5.1 Triploidien kalojen geenien ilmentyminen

Diploideilla organismeilla ilmiasu määräytyy kahden alleelin perusteella, kun taas polyploidisella organismilla yhteen geenilokukseen liittyy useita alleeleja. Triploidilla kalalla jokaiseen lokukseen liittyy kaksi maternaalista alleelia ja yksi paternaalinen alleeli. Tämä saattaa muuttaa lokusten sisäisiä (dominantteja) tai lokusten välisiä (epistaattisia) vuorovaikutuksia (Johnson ym. 2007). Maternaalisen kromosomiston kaksinkertaistuminen lisää mätiä tuottaneen emokalan vaikutusta triploidin jälkeläisen ilmiasuun. Polyploidien kalojen alleelien välisistä vuorovaikutuksista tiedetään kuitenkin vähän. Johnson ym. (2007) tekemässä kokeessa kuningaslohella (*Oncorhynchus tshawytscha*) triploidia lisäsi ilmiasujen variaatiota summautuvien (polygeenisten) geenien säätelemissä ominaisuuksissa. Kokeessa havaittu triploidien kuningaslohien lisääntynyt fenotyyppinen varianssi (esimerkiksi kalan koon suhteen) lisää jalostuksen haasteita, koska muutokset alleelien suhteissa voivat heikentää diploideilla kaloilla tehdyn jalostustyön tuloksia. Ilmiasujen kohonnut varianssi saattaisi lisäksi selittää ristiriitaisia tuloksia kasvatuskokeissa ja epämuodostumien määrissä (Sadler ym. 2001; Johnson ym. 2007).

Alleelien määrän nousu johtaa myös geenien ilmenemistason nousuun yksittäisessä solussa, ja se voi häiritä solun normaalia toimintaa (Ching ym. 2010). Nisäkkäät selviytyvät huonosti tällaisesta ilmenemistason muuntumisesta, mutta monet kalalajit selviytyvät polyploidian aiheuttamista muutoksista geenien ilmenemisessä (Ching ym. 2010). Ilmentymistason nousua kompensoi solujen suurempi koko, joka laimentaa geenien ilmentymisen diploidien kalojen tasolle, jolloin negatiivisia vaikutuksia ei ilmene (Shrimpton 2007; Ching ym. 2010). Toisaalta Pala ym. 2008 havaitsivat triploidia allopolyploidista särkikalaa (*Squalius alburnoides*) tutkiessaan, että maternaalisen ja paternaalisen kromosomiston alleeleja ei ilmennetty eri kudoksissa samassa suhteessa, vaan että alleelien ilmentymistä säädeltiin kudoksetkohtaisesti. Säätelyn johdosta yli-ilmentymistä ei tapahtunut ja solut vaikuttivat toiminnallisesti diploideilta. Triploidien kalojen geenien ilmentymistä tunnetaan kuitenkin huonosti.

## 2.5.2 Hsp-proteiinit

Lämpöshokkiproteiinit (eng. heat shock proteins, *Hsp*) toimivat muun muassa proteiinien kuljetuksessa, laskostamisessa, korjaamisessa ja denaturoituneiden proteiinien uudelleenaktivaatiossa (Basu ym. 2002; Iwama 2004). Hsp-proteiinit jaotellaan perheisiin molekyylipainojensa mukaan. Eri perheet sisältävät useita proteiineja, joiden toiminnot ovat osittain päällekkäisiä. Osaa kirjolohien Hsp-proteiineista ilmennetään jatkuvasti ja ne liittyvät solun normaaliin toimintaan, mutta osa niistä ilmenee vain stressitilanteessa, kuten lämpötilan nousussa (Ojima 2007; Viant ym. 2003). Tärkeimmät lohikalojen tutkimukseen käytetyt proteiinit ovat Hsp70 (68-73 kDa), Hsp90 (85-90 kDa) ja pienikokoiset Hsp-proteiinit (16-47 kDa) (Basu ym. 2002). Hsp70 on parhaiten tunnettu ja eniten tutkittu proteiiniperhe, jonka päätehtävänä on toisten proteiinien laskostaminen ja korjaaminen. Hsp70-proteiiniperheeseen kuuluu jatkuvasti ilmennettäviä ja indusoituvia geenejä. Hsp90-proteiiniperheen toiminta liittyy eniten sytoskeletoniin ja hormonireseptoreihin, kun taas pienikokoiset Hsp-proteiinit ovat ainoastaan indusoituvia.

Lohikalojen stressivasteen tutkimuksessa Hsp-proteiinit ovat tärkein molekyylibiologinen tutkimuskohde, mutta kattavaa tietoa siitä miten eri Hsp-proteiinit ilmenevät eri lajeissa ei vielä ole (Ojima 2005). Hsp-perheen proteiineja ei ilmennetä vain lämpötilan noustessa vaan niiden on havaittu vastaavan hyvin erilaisiin stressitekijöihin kuten suolapitoisuuteen, tauteihin, kemikaaleihin ja hormoneihin (Deane & Woo 2011; Räsänen ym. 2012). Ne eivät ole kuitenkaan yhtä herkkiä näytteenoton ja käsittelyn aiheuttamiin muutoksiin kuin perinteiset stressimittarit kuten kortisoli (Roberts ym. 2010). Hsp-proteiinien käyttö kalojen stressin tutkimisessa ei kuitenkaan ole yksiselitteistä, sillä aikaisemman kasvatushistorian vaikutus vasteisiin voi olla merkittävää (Iwama 2004). Esimerkiksi Werner ym. (2006) havaitsivat laitoskasvatetun kirjolohen *hsp60*- ja *hsp90*-geenien vasteiden lämpöstressiin olevan huomattavasti luonnonkaloja heikompia. Lisäksi *hsp*-geenien tutkimista vaikeuttaa esimerkiksi kirjolohella kromosomiston tetraploidisaatio lajin historiassa. Muinainen tetraploidisaatio on lisännyt samankaltaisten *hsp*-geenien määrää ja niiden erottaminen toisistaan on ajoittain hankalaa. Samalla eri geenien toiminnot voivat olla osittain päällekkäisiä.

### 3. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli verrata pitkäkestoisen lämpötilastressin vaikutusta triploidien ja diploidien kirjolohien selviytymiseen vähähappisissa ja korkeahappisissa tilanteissa. Triploidien kalojen on havaittu kestävän huonosti etenkin pitkäkestoista lämpöstressiä (Ojolic ym. 1995), mutta on epäselvää johtuuko triploidien kalojen diploideja huonompi selviytyminen happistressistä vai pelkästä lämpötilasta. Käyttämällä kahta eri happipitoisuutta voidaan selvittää johtuuko triploidien kalojen heikompi selviytyminen lämpimissä oloissa lähinnä liian korkeasta lämpötilasta vai lämpötilan ja happistressin yhteisvaikutuksesta. Lisäksi kalojen stressin tasoa tutkittiin seuraamalla *hsp*-geenien ilmenemistä. *Hsp*-geenejä käytetään usein lyhytkestoisen stressin tutkimiseen koska vaste on voimakkaimmillaan lyhyen ajan kuluttua lämpötilannoususta, mutta myös pitkäaikainen lämpötilastressi voi aiheuttaa *hsp*-geenien ilmenemistä (Viant ym. 2003). Jos triploidien kalojen *hsp*-geenien ilmentymistasot hapetetussa lämpimässä vedessä ovat diploideja korkeammat se voi viitata niiden olevan stressaantuneempia lämmön vaikutuksesta. Toisaalta jos triploidien ja diploidien kalojen välillä ei ole eroa hapetetussa lämpimässä vedessä, mutta vähähappisessa vedessä triploidit kalat ilmentävät enemmän *hsp*-geenejä kuin diploidit, se viittaisi triploidien ongelmiin happistressiin sopeutumisessa lämpimissä oloissa.

Suurin osa lämpöstressitutkimuksesta on keskittynyt lyhytaikaiseen stressivasteeseen, tässä kokeessa kalat kuitenkin altistettiin pitkäkestoiselle stressille koska lyhytkestoinen lämpöstressi ei ole aiheuttanut eroja kuolleisuudessa eri ploidiatasojen välille (Galbreath ym. 2006). Samalla vertailtiin kalojen kasvunopeutta. Erillisessä kokeessa oli tarkoituksena selvittää diploidien ja triploidien kirjolohien stressigeenien ilmentymisen välisiä eroja viileissä vesissä. Tämän kokeen tarkoituksena oli varmentaa triploidien ja diploidien kalojen *hsp*-geenien ilmentymisen olevan samanlaista kun niitä kasvatetaan mahdollisimman vähän stressaavissa oloissa.

### 4. AINEISTO JA MENETELMÄT

#### 4.1 Kalat

Kokeissa käytettiin Kuopion yliopiston kalantutkimusyksikössä kasvatettuja kolmivuotiaita triploideja ja diploideja kirjolohia. Kalat oli tuotettu vuonna 2007 Molekyylibiologian sovellukset vesiviljelyssä -opintojakson harjoitustyössä. Triploidia oli indusoitu lämpöshokkimenetelmällä (+27

°C, 10 min) viidessä eri hedelmöityksen jälkeisessä aikapisteessä (100 °Cmin, 250 °Cmin, 400 °Cmin, 550 °Cmin ja 700 °Cmin). Hedelmöitettyjä munasoluja oli pidetty +10 °C:ssa shokkikäsitellyn alkamiseen asti ja ne siirrettiin samaan lämpötilaan shokin jälkeen. Kalojen polyploidia astetta ei tutkittu välittömästi vaan kaloja kasvatettiin kolmivuotiaiksi asti shokkiin käytettyjen aikapisteiden mukaan jaotelluissa altaissa vähäisellä ruokinnalla. Kalojen ploidia-aste selvitettiin mittaamalla punasolujen tumien pituudet may-grünwald värjäytyistä verisiveleistä (Taulukko 1) (Nousiainen & Granlund 2011). Tulokset varmennettiin virtausytometrianalyysillä. Näytteenoton yhteydessä kalat yksilömerkittiin PIT-merkillä (personal identification tag), joka sijoitettiin ruumiinonteloon.

Taulukko 1. Triploidisaatiokäsittelyn onnistuminen, elossa säilyneiden kalojen määrät sekä epämuodostumien osuus (Nousiainen & Granlund 2011).

Ryhmä	Kaloja (kpl)	2 N (%)	3 N (%)	2N epämuodostumat (%)	3N epämuodostumat (%)
100 °Cmin	40	75	25	2,5	-
250 °Cmin	101	34	67	-	-
400 °Cmin	74	54	46	-	-
550 °Cmin	11	91	9	-	-
700 °Cmin	48	100	-	12,5	-

Aluksi kokeeseen 1 (Triploidien kirjolohien *hsp*-geenien ilmentyminen viileässä vedessä) ja kokeeseen 2 (Lämpö- ja happistressin vaikutus triploidien kirjolohien selviytymiseen ja *hsp*-geenien ilmentymiseen) valitut triploidit kalat olivat triploidisaatioryhmästä 250 °Cmin ja diploidit kalat olivat yhdistelmä triploidisaatioryhmistä 250 °Cmin ja 400 °Cmin diploideiksi jääneitä kaloja. Vesipumpusta johtuneiden teknisten ongelmien takia kaikki kokeen 2 kalat kuolivat, eikä niistä pystytty ottamaan kudospäytteitä kvantitatiivista PCR-analyysiä varten. Tämän jälkeen molemmat kokeet aloitettiin alusta siten, että molempiin kokeisiin käytetyt triploidit kalat olivat triploidisaatioryhmistä 100 °Cmin, 250 °Cmin ja 400 °Cmin ja diploidit kalat olivat triploidisaatioryhmistä 100 °Cmin, 250 °Cmin, 400 °Cmin ja 550 °Cmin diploideiksi jääneitä kaloja.



## 4.2 Koejärjestely

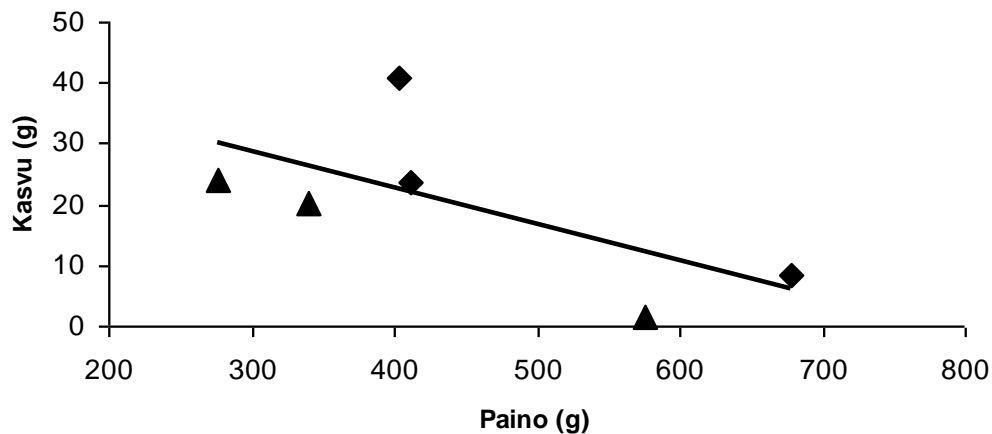
### 4.2.1 Kasvatusolosuhteet

Kokeissa käytetyt triploidit ja diploidit kirjolohet jaettiin lohkoihin painonsa ja ploidia-asteensa perusteella, minkä jälkeen ne arvottiin kahteen eri kokeeseen satunnaisesti niin, että ryhmissä oli yhtä suuret määrät isoja ja pieniä kaloja. Diploidit kalat olivat shokkikäsittelyn saaneita, mutta diploideiksi jääneitä kaloja.

Ennen kokeiden alkua kalat rauhoitettiin pienellä annoksella nukutusainetta (MS222, 0,033g/l, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,033 g/l) ja niiden paino mitattiin rauhoitussammiossa. Punnituksen jälkeen kalojen PIT-merkki luettiin ja ne jaoteltiin koeryhmiin. Ensiksi kalat siirrettiin väliaikaisiin altaisiin (60 l) ja yhden yön jälkeen ne siirrettiin koealtaisiin. Kaloja ei ruokittu siirtoa edeltävänä päivänä eikä kahtena päivänä koealtaisiin siirron jälkeen. Kaloja ruokittiin kokeen aikana 5g/kala/päivä (Efico Enviro 932 kirjolohi (4,5 mm), BioMar), joka aamupäivä lukuun ottamatta kokeen lopettamista edeltävää päivää, jolloin kaloja ei ruokittu. Vesi oli sekoitus rumpusuodatettua pohjavettä ja pintavettä.

Kokeiden aikana veden happipitoisuutta mitattiin kolmena päivänä viikossa. Ulos tulevan veden happipitoisuus määritettiin aamulla ennen ruokintaa ja n. 5 tuntia ruokinnan jälkeen. Altaisiin tulevan veden happipitoisuus määritettiin kerran näytteenottopäivinä.

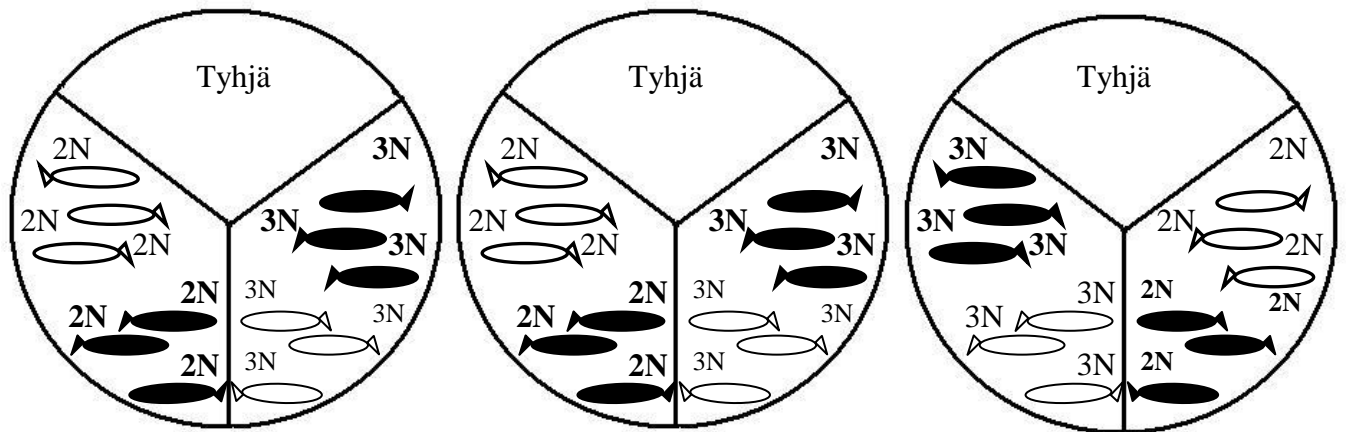
Johtuen suurista painoeroista ryhmien sisällä kaikki käsittelyryhmät jaettiin kahteen osaan odotetun kasvun perusteella (Kuva 2). Jokaisesta ryhmästä selvitettiin korrelaatio kokeen aikana tapahtuneen painon nousun ja kalan alkupainon suhteen. Ne kalat, jotka olivat kasvaneet ryhmäkohtaista kasvuodotusta paremmin (korrelaatio-suoran yläpuolella), jaettiin ryhmään hyvin kasvaneet ja ne jotka olivat kasvaneet huonommin (korrelaatio-suoran alapuolella) jaettiin ryhmään huonosti kasvaneet.



Kuva 2. Esimerkkikuvaaja yhden triploidi-ryhmän kalojen jakamisesta huonosti kasvaneisiin (▲) ja paremmin kasvaneisiin (◆) odotetun kasvun perusteella.

#### 4.2.1.2 Koe 1: Triploidien kirjolohien kuolleisuus ja *hsp*-geenien ilmentyminen viileässä vedessä

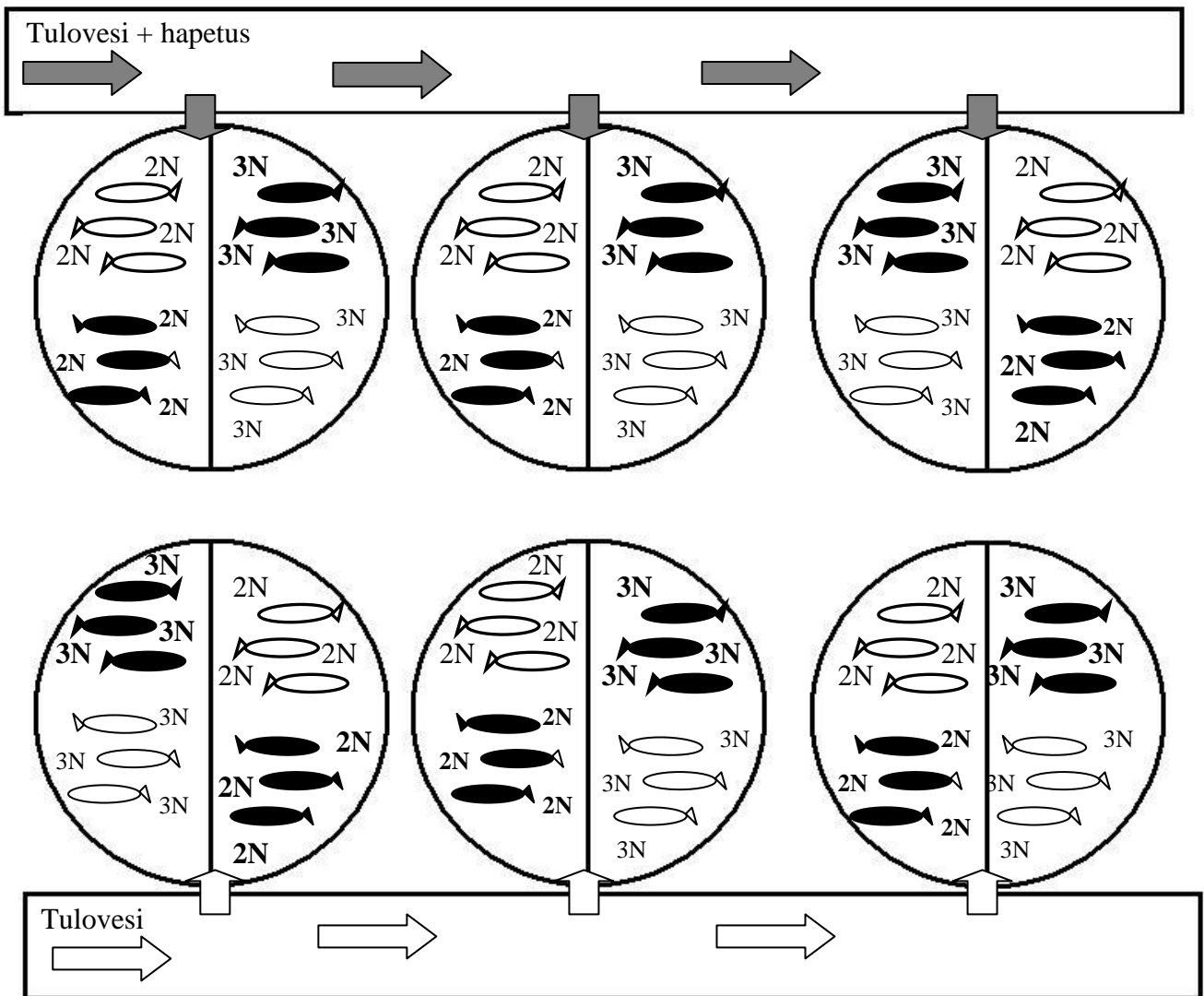
Triploideja ja diploideja kaloja kasvatettiin Kuopion Yliopiston kalantutkimusyksikössä  $10 \pm 1$  °C lämpötilassa 20 vuorokauden ajan. Kasvatukseen käytettiin 180 litran altaita, jotka oli jaettu kolmeen yhtä suureen osaan muovitetulla metalliverkolla, jonka terävät reunat oli suojattu. Verkkojen pysymiseksi paikallaan niissä oli myös painona yksi pyöreä luonnonkivi/ryhmä. Yksi jaetuista osioista oli tyhjä, yhdessä oli 6 triploidia kalaa ja yhdessä 6 diploidia kalaa (Kuva 3). Jokaisella ryhmällä oli n. 60 l uimatilaa. Altaiden virtaus oli n. 20 l/min. Altaiden tuloveden happipitoisuus oli  $8,6 \pm 0,1$  mg/l ja lähtöveden  $8,4 \pm 0,2$  mg/l.



Kuva 3. Triploidien (3N) ja diploidien (2N) kirjolohien (*Oncorhynchus mykiss*) allasjärjestys kokeessa 1. Koeryhmät arvottiin muovitetuilla verkoilla jaettuihin osastoihin. Kokeen jälkeen ryhmät jaettiin hyvin kasvaneisiin (valkoiset kalat) ja huonosti kasvaneisiin (mustat kalat).

#### 4.2.1.3 Koe 2: Lämpö- ja happistressin vaikutus triploidien kirjolohien kuolleisuuteen ja *hsp*-geenien ilmentymiseen

Lämpö- ja happistressin tutkimiseksi lämpimissä oloissa diploideja ja triploideja kaloja kasvatettiin 20 päivää + 20 °C vedessä Elintarviketurvallisuusviraston (EVIRA) Kuopion toimipisteessä. Kokeen alussa kalat totutettiin korkeaan lämpötilaan nostamalla veden lämpöä 1 °C päivässä 10 päivän ajan. Kaloja kasvatettiin 120 l altaissa, jotka oli jaettu kahteen yhtä suureen osaan muovitetulla metalliverkolla (Kuvat 4 ja 5). Kuuden kalan ryhmällä oli n. 60 l uimatilaa. Altaiden vesivirtaus oli n. 12 l/min. Kolme allasta sai hapetettua tulovettä. Hapetetuissa lämpimän veden altaissa tuloveden happipitoisuus oli  $11,9 \pm 0,2$  mg/l ja altaasta lähtevän veden happipitoisuus oli  $8,6 \pm 0,4$  mg/l. Vähähappisissa lämpimän veden altaissa tuloveden happipitoisuus oli  $8,9 \pm 0,02$  mg/l ja altaasta poistuvan veden  $6,5 \pm 0,3$  mg/l.



Kuva 4. Triploidien (3N) ja diploidien (2N) kirjolohien (*Oncorhynchus mykiss*) allasjärjestys kokeessa 2. Koeryhmät arvottiin muovitetuilla verkoilla jaettuihin osastoihin. Kolme allasta sai lisähapetta tulovedessä (harmaat nuolet). Kokee jälkeen ryhmät jaettiin hyvin kasvaneisiin (valkoiset kalat) ja huonosti kasvaneisiin (mustat kalat).



Kuva 5. Kuva kokeessa 2 käytetystä altaasta.

### 4.2.3 Näytteenotto

Kokeen päättyessä kalat poistettiin altaista haavilla ja lopetettiin nopeasti iskemällä päähän. Kaloista mitattiin pituus sekä paino ja niistä otettiin lihas, sydän, maksa ja munuaisnäytteet (n. 1 g/kudos). Lihasnäytteet otettiin kalan kyljestä lihaksen paksuimmalta kohdalta ja munuaisnäytteet munuaisten kraniaalisesta kärjestä. Kudoksenäytteet säilöttiin RNAlater-liuokseen (RNAlater RNA Stabilization Reagent, Qiagen, 500 µl) ja pakastettiin säilytystä varten (-70 °C). *Hsp*-geenien ilmeneminen määritettiin lihasnäytteistä.

## 4.3 Laboratoriotyöt

### 4.3.1 RNA:n eristys ja DNAasi käsittely

Säilytyistä lihasnäytteistä eristettiin RNA. Näytteestä otettiin käsittelyyn noin puolet ja se hierrettiin TRIzol Reagent -liuoksessa (500 µl, Molecular Research Center). Homogenisoituun näytteeseen lisättiin 500 µl TRIzol reagenssia ja näytettä inkuboitii 5 minuuttia (HL). Näytteeseen lisättiin 200 µl kloroformia ja sekoitettiin voimakkaasti (20 s). Näytteitä inkuboitii (2 min HL) ja sentrifugoitii (15 min, 12 000 g, 4 °C). RNA:n eristystä varten näytteen yläfaasi erotettiin ja loput

säilöttiin pakkaseen (-70 °C). Erotettuun yläfaasiin lisättiin 500 µl isopropanolia ja näytettä sentrifugoitiin (12 000 g, 10 min, 4 °C). Saatu RNA-pelletti pestiin kahdesti (1 ml, 75 % EtOH). Sakka kuivatettiin (n. 10 min, HL) ja liuotettiin (30 µl, H<sub>2</sub>O). RNA:n pitoisuus mitattiin spektrofotometrisesti (Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer)

Alun perin näytteille tehtiin cDNA-synteesi (Verso™ SYBR Green 2-Step QRT-PCR Kit), mutta kvantitatiivisissa PCR-analyseissä havaittiin näytteiden sisältävän genomista DNA:ta. Siksi RNA-näytteet käsiteltiin uudestaan genomisen DNA:n poistamiseksi (DNA-Free RNA Kit; ZymoResearch) ja puhdistettu RNA-liuotettiin veteen (10 µl).

### **4.3.2 Näytteiden yhdistäminen ja cDNA-synteesi**

Kasvun perusteella ryhmiin jaettujen kalojen RNA-näytteet yhdistettiin keskenään tasaten RNA:n määrän siten, että yhdistelmänäytteeseen tuli yhteensä 1 µg RNA:ta. Näytteistä tehtiin cDNA synteesi [4 µl 5 x reaktio puskuri; 0,5 µl RNAasi-inhibiittori (Ribolock RNase inhibitor, 1 U/µl Thermo Scientific)], 2 µl dNTP (10 mM); 1 µl käänteistranskriptaasi (RevertAid MuLV Reverse Transcriptase 200 U/µl Fermentas; RNA 1 µg). Näytteitä inkuboitiin (60 min + 42 °C ja 10 min + 70 °C) (PTC-200 Thermal Cycler, MJ Reeach), minkä jälkeen ne siirrettiin pakkaseen (-20 °C). cDNA synteesissä oli mukana kaksi käänteistranskriptaasia sisältämätöntä kontrollinäytettä.

### 4.3.3 Kvantitatiivinen PCR

Kaikista cDNA-näytteistä tutkittiin *hsp30*:n, *hsp70*:n ja *hsp90*:n suhteelliset mRNA-tasot kvantitatiivisella PCR-menetelmällä. Käytetyt alukkeet olivat *hsp30*, *hsp70* ja *hsp90* (Taulukko 2). Analyysiä varten testattiin kontrolligeenit *EF1α*, *RPL2* ja *NUOR*. Analyyseissä käytettiin *NUOR*-geeniä, koska sen ilmentymistasot vastasivat parhaiten *hsp*-geenien ilmentymistasoja ja sen ilmentyminen oli tasaista käsittelyryhmien välillä.

Näytteet analysoitiin kvantitatiivisella PCR-reaktiolla (SYBR Green 2-Step QRT-PCR Kit; alukkeiden pitoisuus reaktiossa 70 nM; 1,4 µl cDNA). cDNA-näytteet oli laimennettu 1:50. Kaikki näytteet tehtiin kahtena replikaattina ja analyysit toistettiin kerran. Jokaisessa ajossa cDNA:sta tehtiin laimennossarja (1:10, 1:100, 1:1000, 1:2000) yhden cDNA-näytteen avulla. Jokaisesta laimennossarjasta laskettiin standardisuora (kynnyssykli verrattuna laimennossarjan logaritmiin), jonka avulla laskettiin monistumistehokkuus (E):

$$E = (10^{-1/\text{standardisuoran kulmakerroin}} - 1) * 100$$

Analysointiin hyväksyttiin ainoastaan tulokset ajoista, joissa monistumistehokkuus oli riittävä ( $0.8 < E < 1.1$ ). Geenien ilmentymistasot laskettiin standardisuoran yhtälön avulla ja lopulta normalisoitiin ensin *NUOR* geenin määrään ja verrattiin sitten kontrollikäsittelyyn. Kokeessa 1 kontrollina olivat hyvin kasvaneet diploidit kalat ja kokeessa 2 kontrollina olivat hapetetussa vedessä hyvin kasvaneet diploidit kalat. Kaikissa ajoissa oli mukana entsyymitön cDNA-synteesi näyte ja näyte, jossa ei ollut cDNA:ta.

Taulukko 2. *Hsp*- ja kontrolligeenien monistamiseen käytetyt alukkeet

Geeni	Emäsjärjestys (5' → 3')
<i>EF1α</i> elongation factor 1 α	F: CAC CGG CCA TCT GAT CTA CAA R: TCA GCA GCC TCC TCC TTC TCG AAC TTC
<i>RPL2</i> ribosomal protein L2	F: TAA CGC CCT CTT CAC GTT GA R: ATG AGG GAC CTT GTA GCC AGC AA
<i>NUOR</i> NADH-ubiquione oxidoreductase	F: CAA CAT AGG GAT TGG AGA GCT GTA CG R: TTC AGA GCC TCA TCT TGC CTG CT
<i>hsp30</i> heat shock protein 30	F: GTG GGA AGG AAG CTG AGA GTC AGT R: CTC AGG ATT CAC GCC TTC AGG CAG
<i>hsp70</i> heat shock protein 70	F: TGG CGA CAA GTC TGA GAA CGT CCAG R: GGT CTG TTT GGA TGG GAT GGT GGT G
<i>hsp90</i> heat shock protein 90	F: CAAGGTGGG AAT CCA TGA AGA CG R: CAG GGA GAC CAT TTC GTC AGCG

#### 4.4 Kasvutulosten käsittely

Kalojen pituudesta, painosta, ruumiinmuodosta (pituus/paino) kokeen alussa laskettiin keskiarvot. Kaloista laskettiin myös kuntokerroin:

$$\text{Kuntokerroin} = \text{paino (g)} / \text{pituus (cm)}^3 * 100$$

Johtuen ryhmien välisistä kokoeroista pituuden ja painon kasvu laskettiin suhteellisena päiväkohtaisena kasvuna (SGR) (Sacobie ym. 2012) käyttäen kaavoja:

$$\text{SGR}_{\text{Paino}} (\% \text{päivä}^{-1}) = [\ln(M_{\text{loppu}}) - \ln(M_{\text{alku}})] / d * 100$$

$$\text{SGR}_{\text{Pituus}} (\% \text{päivä}^{-1}) = [\ln(P_{\text{loppu}}) - \ln(P_{\text{alku}})] / d * 100$$

joissa  $M_{\text{loppu}}$  on paino kokeen lopussa (g),  $M_{\text{alku}}$  on paino kokeen alussa (g),  $P_{\text{loppu}}$  on pituus kokeen lopussa (cm),  $P_{\text{alku}}$  on pituus kokeen alussa (cm) ja  $d$  on päivinä kulunut aika.



## 4.5 Tilastolliset analyysit

Kaikki tilastolliset analyysit tehtiin IBM SPSS Statistics 19 -ohjelmalla. Kalojen painosta, pituudesta ja ruumiinmuodoista kokeen alussa laskettiin keskiarvot ja hajonnat. Erot triploidien ja diploidien kalojen välillä kokeiden alussa analysoitiin riippumattomien näytteiden t-testillä.

Kokeessa 1 erot painon ja pituuden kasvussa sekä *hsp*-geenien ilmenemisessä laskettiin lineaarisella sekamallilla käyttäen kasvatusallasta satunnaismuuttujana ja ploidiatasoa sekä kasvuodotusta (hyvin ja huonosti kasvaneet) kiinteinä muuttujina. Kokeen 2 tulokset laskettiin lineaarisella sekamallilla käyttäen kasvatusallasta satunnaismuuttujana ja ploidiaryhmää, kasvuodotusta sekä happitasoa kiinteinä muuttujina.

## 5. TULOKSET

### 5.1 Triploidien ja diploidien kalojen kasvu ja ruumiinmuoto kokeissa 1 ja 2

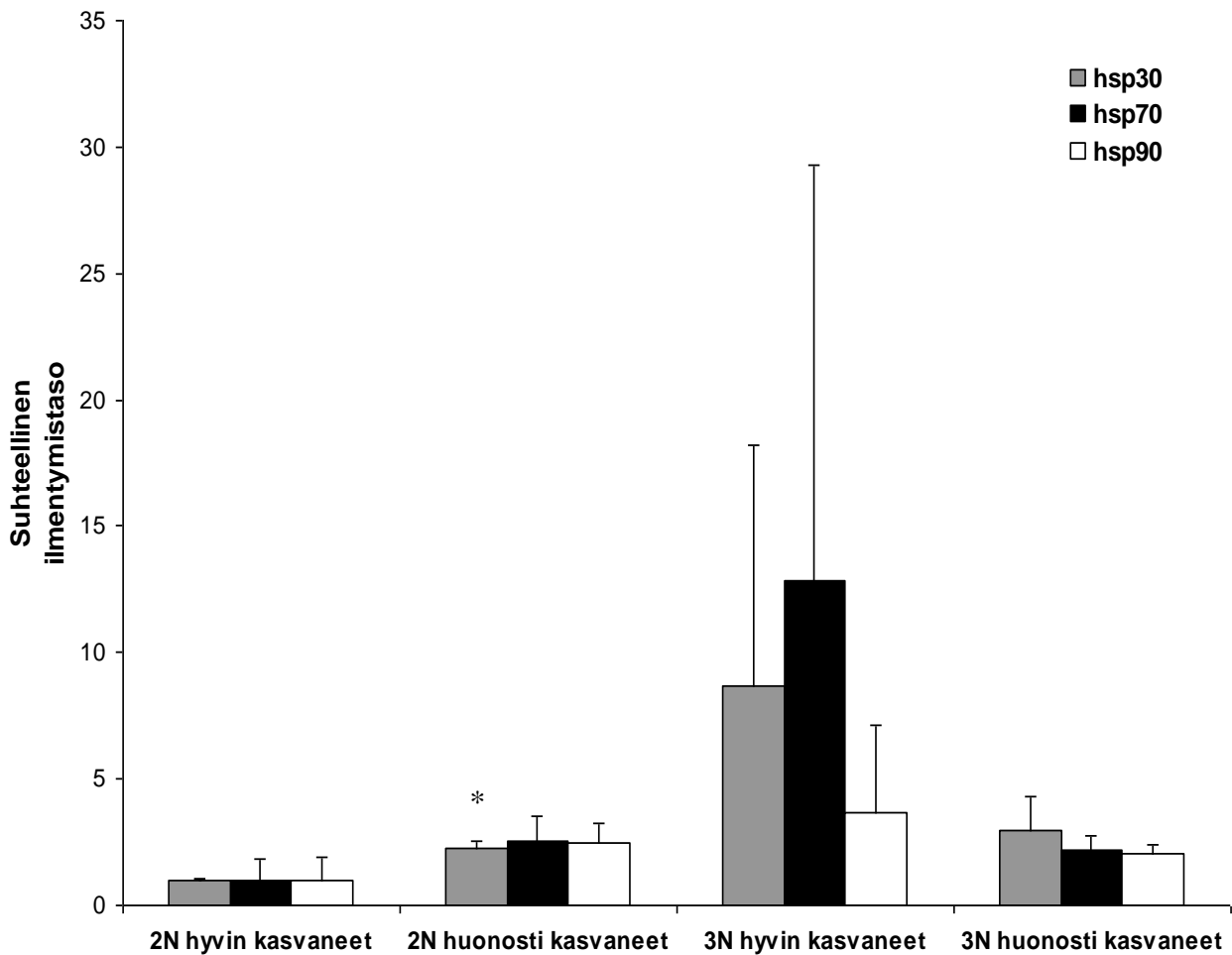
Kokeisiin valitut diploidit kalat olivat merkitsevästi suurempia kuin triploidit (Taulukko 3). Triploidien ja diploidien kalojen kuntokertoimet eivät eronneet toisistaan. Triploidien kalojen painon suhteellinen päiväkohtainen nousu ( $SGR_{\text{Paino}}$ ) oli diploideja suurempaa kaikissa ryhmissä, mutta ero oli tilastollisesti merkitsevä ainoastaan kokeessa 1 ( $p = 0,002$ ). Triploidien kalojen suhteellinen päiväkohtainen pituuskasvu ( $SGR_{\text{Pituus}}$ ) oli myös hiukan diploideja nopeampaa, mutta ero oli merkitsevä ainoastaan vähähappisessa vedessä kokeessa 2 ( $p = 0,05$ ).

Taulukko 3. Diploidien ja triploidien kirjolohien pituus, paino ja kuntokerroin kokeiden 1 ja 2 alussa, sekä kasvu kokeiden aikana. Tilastolliset erot diploidien ja triploidien kalojen välillä käsittelyryhmien sisällä on merkitty kirjaimin a, b ( $p \leq 0,05$ ).

	Käsittelyryhmät	Ploidia	Paino kokeen alussa (g)	Pituus kokeen alussa (cm)	Kuntokerroin	SGR <sub>Paino</sub> (%päivä <sup>-1</sup> )	SGR <sub>Pituus</sub> (%päivä <sup>-1</sup> )
Koe 1	+10 °C	2N	501 <sup>a</sup> (±90)	35,3 <sup>a</sup> (±3,0)	1,1 (±0,2)	1,03 <sup>a</sup> (±0,31)	0,31 (±0,19)
	+10 °C	3N	362 <sup>b</sup> (±66)	31,8 <sup>b</sup> (±2,0)	1,1 (±0,2)	1,39 <sup>b</sup> (±0,32)	0,38 (±0,2)
Koe 2	Hapetettu +20 °C	2N	525 <sup>a</sup> (±121)	33,9 (±3,1)	1,4 (±0,3)	0,74 (±0,37)	0,36 (±0,25)
	Hapetettu +20 °C	3N	439 <sup>b</sup> (±113)	32,3 (±3,6)	1,3 (±0,4)	0,81 (±0,47)	0,48 (±0,32)
	+20 °C	2N	537 <sup>a</sup> (±136)	34,8 <sup>a</sup> (±3,7)	1,3 (±0,3)	0,82 (±0,46)	0,34 <sup>a</sup> (±0,18)
	+20 °C	3N	414 <sup>b</sup> (±93)	32,3 <sup>b</sup> (±2,3)	1,2 (±0,2)	0,95 (±0,51)	0,46 <sup>b</sup> (±0,16)

## 5.2 Koe 1: Triploidien kirjolohien kuolleisuus ja *hsp*-geenien ilmentyminen viileässä vedessä

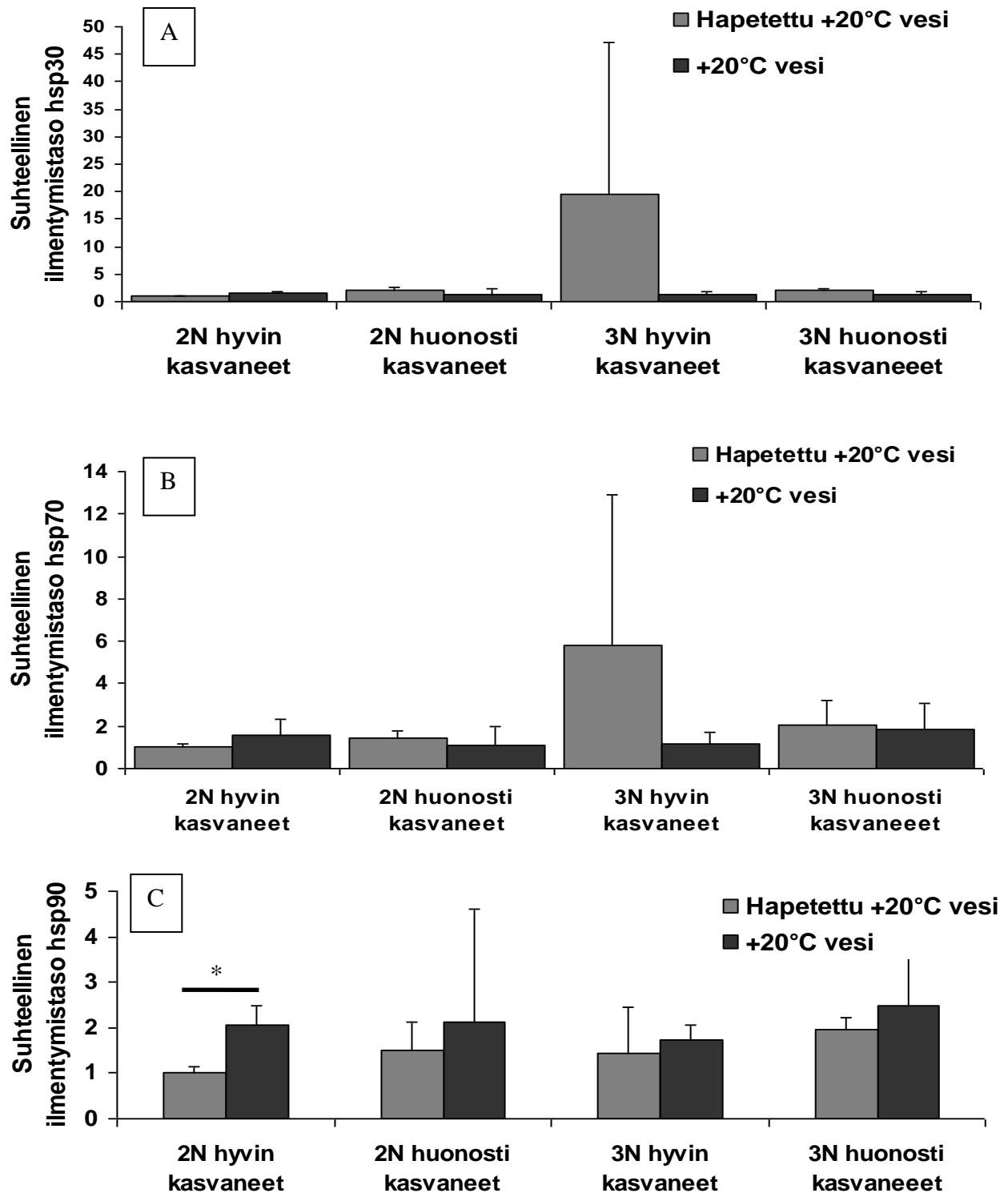
Yksikään triploidi tai diploidi kala ei kuollut kokeen aikana. *Hsp*-geenien ilmentymistasoissa ei havaittu eroja triploidien ja diploidien välillä. Hyvin kasvaneiden diploidien kalojen (kontrolli) *hsp30*-geenin ilmentymistaso oli merkitsevästi matalampi ( $p < 0,001$ ) kuin huonosti kasvaneiden diploidien (Kuva 6). Myös *hsp70*- ja *hsp90*-geenit ilmentyivät kontrollia voimakkaammin huonosti kasvaneilla diploideilla kaloilla, mutta tulos ei ollut merkitsevä. Muita eroja *hsp*-geenien (*hsp30*, *hsp70* ja *hsp90*) ilmentymistasoissa ei havaittu. Suhteellisesti huonommin kasvaneet diploidit ilmensivät *hsp* -geenejä hieman enemmän kuin paremmin kasvaneet diploidit. Suhteellisesti paremmin kasvaneilla triploideilla kaloilla näytteiden hajonta oli erittäin suuri.



Kuva 6. Diploidien (2N) ja triploidien (3N) kirjolohien lihaskudoksen *hsp30*-, *hsp70*- ja *hsp90*-geenien ilmentyminen viileässä vedessä (+10 °C). Geenien ilmentymistasot on suhteutettu hyvin kasvaneiden diploidien kalojen geenien ilmentymistasoihin. Merkitsevä ero ( $p < 0,001$ ) kontrolliin verrattuna on merkitty \*.

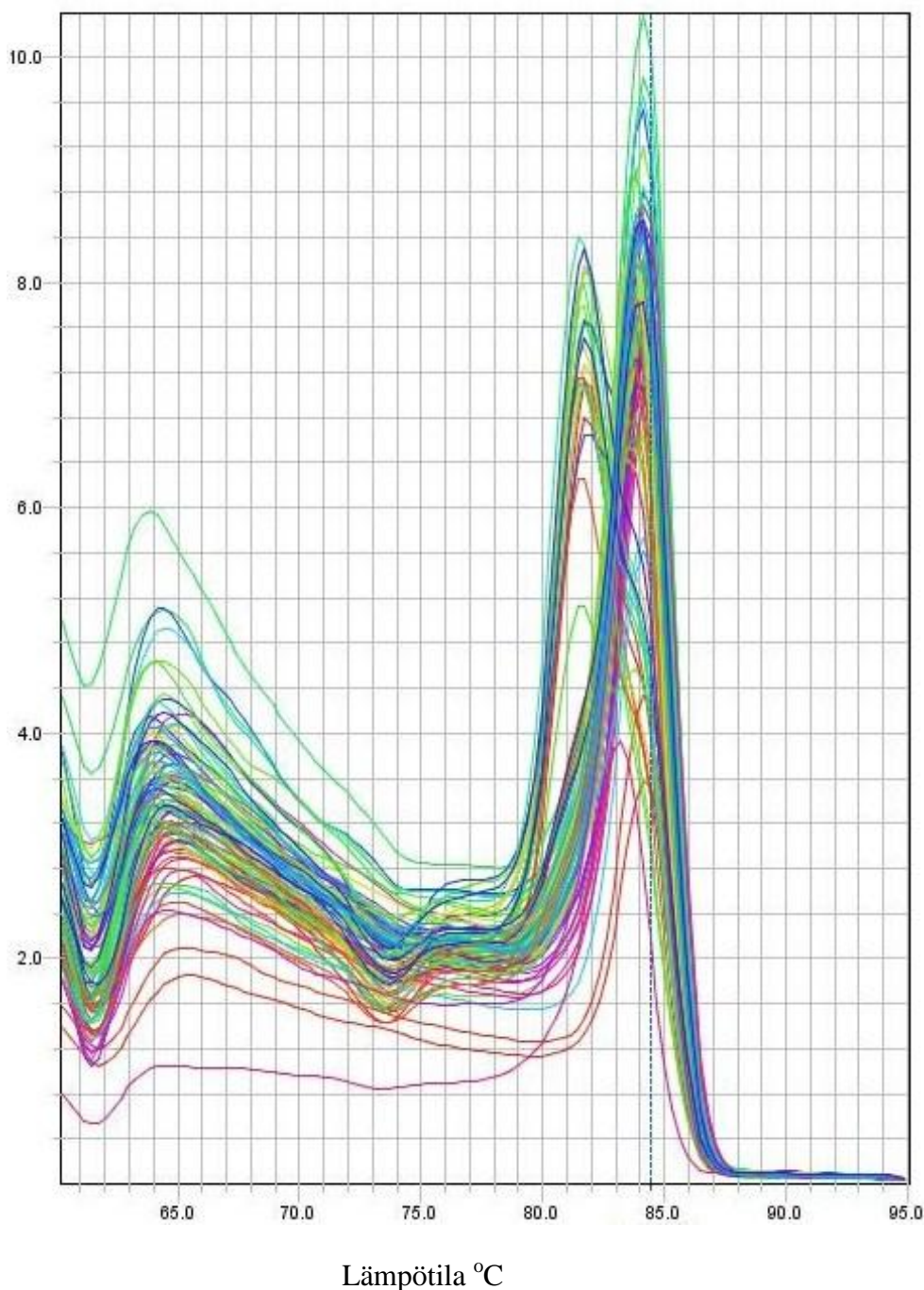
### 5.3 Koe 2: Lämpö- ja happistressin vaikutus triploidien kirjolohien kuolleisuuteen ja *hsp*-geenien ilmentymiseen

Yksikään triploidi tai diploidi kala ei kuollut kokeen aikana. Triploidien ja diploidien kalojen *hsp*-geenien ilmentymistasot eivät eronneet toisistaan merkitsevästi (Kuva 7). Suhteutettuna hapetetussa vedessä hyvin kasvaneisiin diploideihin kaloihin (kontrolli) vähähappisessa vedessä hyvin kasvaneet diploidit kalat ilmensivät *hsp90*-geeniä merkitsevästi kontrollia enemmän ( $p = 0,026$ ). Muita tilastollisia eroja ryhmien välillä ei havaittu.



Kuva 7 Pitkäkestoisen lämpö- ja happistressin vaikutus lihaskudoksen *hsp30*- (A), *hsp70*- (B) ja *hsp90*- (C) geenien ilmentymiseen hyvin kasvaneilla ja huonosti kasvaneilla diploideilla ja triploideilla kirjolohilla. Geenien ilmentymistasot on suhteutettu hapetetussa vedessä hyvin kasvaneiden diploidien kalojen geenien ilmentymistasoihin. Merkitsevä ero ( $p < 0,05$ ) ryhmien välillä on merkitty \*.

*Hsp70*-geenin kvantitatiivisen PCR-reaktion sulamiskäyrä-analysissä näkyi kaksi eri monistustuotetta (Kuva 8). Lähes kaikissa + 10 °C:ssa kasvatettujen kirjolohien (2N & 3N) PCR tuotteiden sulamiskäyrissä oli vain yksi huippu (n. 81 °C ), mutta kahdessa + 10 °C yhdistelmänäytteessä ja kaikissa +20 °C vedessä kasvatettujen kirjolohien PCR-tuotteiden sulamiskäyrissä oli joko yksi huippu (n. + 84 °C) tai kaksi huippua (n. 81 °C ja 84 °C). PCR-tuotteita yritettiin sekvensoida, mutta kunnollista sekvenssiä ei saatu.



Kuva 8. *hsp70*-geenin cDNA:sta monistettujen PCR-tuotteiden sulamiskäyrät kokeissa 1 ja 2.

## 6. POHDINTA

### 6.1 Tutkimuksen tarkoitus

Tämä tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää eroja triploidien ja diploidien kalojen *hsp*-geenien ilmenemisessä viileässä vedessä ja sitä miten pitkäkestoinen lämpö- ja happistressi vaikuttavat triploidien kalojen kuolleisuuteen ja *hsp*-geenien ilmentymiseen.

### 6.2 Kalat

Kokeissa käytetyt triploidit kirjolohet oli tuotettu lämpöshokkimenetelmällä viidessä eri aikapisteessä. Triploidisaatiokäsittelyn tuloksia on kuvattu tarkemmin tutkimusprojektissa, jossa selvitettiin kalojen ploidia-aste (Nousiainen & Granlund 2011). Kokeissa käytetyt kalat olivat yhdistelmä eri aikapisteissä tuotettuja kaloja ja se on luultavasti lisännyt tulosten hajontaa, sillä käytetyllä shokilla voi olla triploidiaan liittymättömiä vaikutuksia (Malison ym. 1993). Shokin vaikutukset näkyivät myös tämän kokeen kaloissa, sillä epämuodostumien suuri määrä ryhmässä 700 °Cmin on luultavasti johtunut lämpöshokin aiheuttamista muutoksista. Polyploidisaatiokokeessa ei kuitenkaan ollut rinnakkaisia käsittelyryhmiä, joten tuloksiin täytyy suhtautua varauksella.

Kolmivuotiaat kirjolohet olivat erittäin pienikokoisia ikäisikseen, koska niitä oli kasvatettu vähäisellä ruokinnalla suurissa tiheyksissä. Viljelyssä olevien kirjolohien odotetaan olevan yhtä painavia n. vuoden ikäisinä (Bonnet ym. 1999). Kokeeseen valitut triploidit kalat olivat sekä painoltaan että pituudeltaan merkitsevästi pienempiä kuin diploidit. Triploidien kalojen on havaittu kasvavan heikommin yhteiskasvatuksessa diploidien kanssa (Maxime 2008). Suurin syy hajontaan ryhmien sisällä ja kokoeroihin ryhmien välillä tässä kokeessa oli kuitenkin se, että triploidit ja diploidit kalat tulivat useasta eri kasvatusaltaasta, joiden kalatiheydet vaihtelivat. Triploidien ja diploidien kuntokertoimet olivat kuitenkin samanlaiset, vaikka toisissa kokeissa triploidien kalojen on havaittu olevan hoikempia (Bonnet ym. 1999; Blanc ym. 2001; Friars ym. 2001). Materiaalin epätasaisuus ja erot käsittelyryhmien välillä heikentävät kaikkien kokeesta saatujen tulosten vertailtavuutta. On myös epäselvää, miten kalojen epätavallisen pieni koko vaikuttaa kokeesta saatuihin tuloksiin.

### 6.3 Kirjolahien kasvu kokeen aikana

Kokeessa 1 triploidien kalojen painon ja pituuden suhteellinen päiväkasvu oli diploideja kaloja nopeampaa, mutta tuloksia on saattanut vääristää triploidien kalojen pienempi koko kokeen alussa. Kaloille syötettiin rehua, jota suositellaan 100 – 450 g painoisille kaloille, joten se on saattanut heikentää tätä isompien kalojen kasvua. Tämä voisi vaikuttaa etenkin diploideihin kaloihin, joiden keskimääräinen paino kokeen alussa oli yli 500 g. Kasvutulosten vertailu onkin erittäin hankalaa johtuen triploidien ja diploidien kalojen välisistä eroista kokeen alussa, sekä suurista koeryhmien sisäisistä kokoeroista, jotka ovat saattaneet johtaa kilpailuun altaiden sisällä. Yleensä lohikaloja yritetään kasvattaa mahdollisimman tasakokoisissa ryhmissä kasvutulosten parantamiseksi (Ellis ym. 2002). On kuitenkin huomattava, että triploidien kalojen painon kasvu oli selkeästi diploideja parempaa viileässä vedessä, mutta lämpimässä vedessä ero ei ollut yhtä suuri. Myös aiemmissa kokeissa on havaittu, että triploidien kalojen kasvu heikkenee diploideja enemmän stressaavissa olosuhteissa (Maxime 2008; Piferrer ym. 2009).

### 6.4 Koe 1: Triploidien kirjolahien kuolleisuus ja *hsp*-geenien ilmentyminen viileässä vedessä

Viileässä vedessä tehdyssä kokeessa yksikään triploideista tai diploideista kaloista ei kuollut ja oletuksen mukaisesti triploidien ja diploidien kalojen *hsp*-geenien ilmentymistasoissa ei havaittu eroja. Triploidien kalojen geenien ilmentymistasot näyttävätkin vastaavan diploidien kalojen ilmentymistasoja hyvissä kasvatusolosuhteissa (Johnson ym. 2007; Ching ym. 2010).

Koska kirjolahien painot vaihtelivat koeryhmien sisällä, ne oli jaettu kasvuodotuksensa perusteella hyvin ja huonosti kasvaneisiin. Dominanssi ja hierarkia altaan sisällä vaikuttavat kirjolahien kasvuun ja hyvinvointiin (Ellis ym. 2002). Oletuksena ryhmien jakamisessa olikin se, että kasvuodotusta paremmin kasvaneet olisivat stressaantuneet vähemmän kasvatusoloista, kuin huonommin kasvaneet. Hyvin kasvaneet diploidit kalat ilmensivätkin *hsp30*-geeniä merkitsevästi vähemmän kuin huonosti kasvaneet. Myös *hsp70*- ja *hsp90*-geenit ilmentyivät voimakkaammin huonosti kasvaneilla kuin hyvin kasvaneilla diploideilla kaloilla, mutta tulos ei ollut merkitsevä. Tulosten perusteella näyttää kuitenkin siltä, että altaiden sisällä oleva kilpailu on aiheuttanut stressiä ja paremmin kasvaneet kalat ovat olleet vähemmän stressaantuneita. Kasvuodotuksen perusteella tehty näytteiden yhdistely näyttää myös toimineen diploideilla kaloilla ja ennustaneen stressin tasoa.

Triploidien kalojen *hsp*-geneissä ei havaittu dominanssista johtuvia eroja, mutta hajonta triploidien kalojen *hsp*-geenien ilmentymistasoissa oli erittäin suurta.

## **6.5 Koe 2: Lämpö- ja happistressin vaikutus triploidien kirjolohien kuolleisuuteen ja *hsp*-geenien ilmentymiseen**

Toisessa kokeessa tutkittiin happistressin vaikutusta triploidien ja diploidien kalojen selviytymiseen ja *hsp*-geenien ilmentymiseen lämpimissä vesissä. Yksikään kala ei kuollut kokeen aikana, vaikka osassa aikaisemmista tutkimuksista pitkäkestoinen kasvatus +20 °C:ssa on johtanut triploidien kirjolohien suureen kuolleisuuteen (Ojolic ym. 1995). Edes alhainen happipitoisuus yhdistettynä korkeaan lämpötilaan ei johtanut yhdenkään kalan kuolemaan. Toisaalta triploidilla puronieriällä +19 °C kasvatuslämpötila ei johtanut kuolleisuuteen kuukauden kasvatuksen aikana, mutta vasta lämpöstressin jälkeinen liikunta aiheutti kuolleisuutta (Hyndman 2003). Triploidien kuolleisuus voikin johtua yhdistelmästä useita stressitekijöitä (Maxime 2008). Tämän kokeen perusteella triploidit kirjolohet selvisivät hengissä kasvatukselta yhtä hyvin kuin diploidit. Mutta on myös mahdollista, että 20 päivän kasvatusjakso oli liian lyhyt johtamaan kuolleisuuteen, tai että olosuhteet eivät olleet riittävän ankarat aiheuttamaan eroa triploidien ja diploidien kalojen kuolleisuudessa.

Ainoa happistressin aiheuttama merkittävä muutos kontrolliin (hapetetussa vedessä hyvin kasvaneet diploidit kalat) verrattuna oli *hsp90*-geenin kohonnut ilmentyminen vähähappisessa vedessä hyvin kasvaneilla diploideilla kaloilla. Yhdessäkään toisessa käsittelyryhmässä happistressin ei havaittu aiheuttavan merkitsevää muutosta *hsp*-geenien ilmentymiseen. Se, että happistressi ei aiheuttanut merkittävää muutosta diploideissa kaloissa, tekee tulosten tulkinnasta haasteellista, koska on epäselvää olivatko olosuhteet riittävän haasteellisia ja olivatko käytetyt *hsp*-geenit sopivia. Ilmentymistasojen muutokset ovat myös saattaneet jäädä näytteenotosta johtuneen stressin varjoon. Ellis ym. (2002) katsausartikkelin mukaan lohikaloiden kasvatuksessa suositeltu happipitoisuus haitallisten vaikutusten välttämiseksi olisi yli 5-6 mg/l, mutta joidenkin tutkimusten mukaan heikentyntä kasvua ja kuolleisuutta esiintyy jo korkeammissa happipitoisuuksissa. Tässä kokeessa vähähappisen ryhmän ulostuloveden happipitoisuus oli keskimäärin 6,5 ±0,4 mg/l, eli selvästi heikompi kuin lisähappea saaneen ryhmän (8,6 ±0,4 mg/l). On kuitenkin mahdollista, että happistressi ei ollut riittävä muuttamaan *hsp*-geenien ilmentymistasoja. Erojen vähäinen määrä saattaa myös johtua kasvatusajan pituudesta. Esimerkiksi Viant ym. (2003) tutkimuksessa



kirjolohtien *hsp*-geenien ilmeneminen oli voimakkaimmillaan muutaman päivän kuluttua lämpöstressin alkamisesta, mutta vaste heikkeni ajan kuluessa. Vasteen heikkeneminen voi johtua kalojen sopeutumisesta tilanteeseen, mikä on voinut tapahtua myös tässä tutkimuksessa.

Erikoisin tulos kokeessa oli *hsp70*-geenin kvantitatiivisen PCR-tuotteen sulamiskäyrien eroissa kylmässä (Koe 1 + 10 °C) ja lämpimässä (Koe 2, +20 °C) vedessä olleiden kalojen välillä. Syy kahdelle huipulle sulamiskäyrissä johtuu kahdesta eri monistustuotteesta. Kirjolohtella on *hsp70*-geenistä kaksi eri muotoa (*hsp70a* ja *hsp70b*), jotka molemmat ilmentyvät lämpöstressissä (Ojima ym. 2005a, 2005b). *Hsp70a* ja *hsp70b* ovat luultavimmin kaksi erillistä geeniä, jotka kuitenkin molemmat indusoituvat lämpöstressistä. Tämä ei ole epätavallista, sillä kirjolohten evolutiivisessa historiassa tapahtuneen polyploidisaation vuoksi *hsp*-geneistä on useita läheisiä muotoja, joiden erottaminen voi olla vaikeaa (Legat & Iwama 2003; Ojima 2007). Tässä kokeessa käytetyt alukkeet ovat yhteensopivia molempien geenien kanssa (NCBI BLAST, [blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)), ja geenimuotojen monistustuotteet ovat yhtä pitkät (132 emäsparia) eikä monistustuotteiden emäsjärjestyksessä ole eroa. Kuitenkin Ojiman ym. (2005a) mukaan yli +28 °C:n lämpötilassa RTG-2-soluissa (kirjolohten sukurauhasten fibroblastisolut, rainbow trout gonadal fibroblasts) sekä *hsp70a*- että *hsp70b*-geenistä ilmentyi lyhyen muodon lisäksi pitempää mRNA-muotoa. Tutkimuksessa ei saatu sekvensoitua geenien pitempiä muotoja, mutta niiden pääteltiin olevan erilaisesta silmukoinnista johtuvia. Samantyyppinen tulos on saatu kirjolohten *hsp27*-geenistä, josta on havaittu kahta eri tavalla silmukoitua mRNA:ta, joiden ilmentymistasot riippuvat lämpöstressistä (Ojima 2007).

Tämän tutkimuksen perusteella on mahdotonta erottaa *hsp70a*- ja *hsp70b*-muotoja toisistaan, mutta on luultavaa että jompikumpi tai molemmat geneistä ilmentyivät osittain silmukoidussa muodossa pitkäkestoisien lämpötilan nousun jälkeen. Toisaalta pelkkien sulamislämpötilojen perusteella on vaikea arvioida täysin varmasti oliko tässä kokeessa kysymys vaihtoehtoisesta silmukoinnista vai esimerkiksi alukkeiden epäspesifisestä sitoutumisesta toisiin geeneihin. Jos kyseessä ovat silmukoitumistuotteet, pitäisi lyhyiden ja pitkien tuotteiden kokoeron olla samanlainen kuin Ojiman ym. (2005a) tutkimuksessa. Sulamislämpötila kuvaa monistetun tuotteen pituutta ja GC-pitoisuutta, mutta pelkän sulamislämpötilan perusteella on vaikea arvioida monistustuotteen pituutta. Sulamislämpötilatuloksen perusteella voidaan kuitenkin sanoa, että lämpimässä kasvatus vaikutti kalojen geenien ilmentymiseen, joko *hsp70*-geenin mRNA:n silmukointina tai läheisen geenimuodon ilmentymisenä.

## 6.6 Yhteenveto

Tämän tutkimuksen mukaan triploidit kirjolohet sietivät pitkäkestoista lämpötilastressiä ja happistressiä yhtä hyvin kuin diploidit kalat. Happistressi ei aiheuttanut merkittävää vastetta *hsp*-geenien ilmentymisessä, mikä oli ongelmallista, koska on epävarmaa oliko aiheutettu stressi riittävä, olivatko käytetyt *hsp*-geenit soveltuvia vai oliko kasvatusaika liian pitkä. Yksi syy merkitsevien erojen vähyyteen *hsp*-geenien ilmenemisessä oli pienessä rinnakkaisten määrässä ja suuressa hajonnassa näytteiden välillä. Hajontaa tuloksiin on varmasti lisännyt se, että käytetty kalamateriaali oli epätasaista. Kalojen kokoerot olivat suuria ja kokeeseen valitut kalat oli tuotettu useassa eri käsittelyryhmässä (triploidisaation aikapisteet). Suuri hajonta on voinut johtua myös ongelmista näytteenotossa (esim. kala ei ole kuollut lopetukseen käytetystä iskusta ja sen stressitaso on noussut ennen näytteenottoa) tai, että lopetusmenetelmä oli liian stressaava ja peitti alleen muut stressireaktiot. Toisaalta kalojen lopetus yritettiin suorittaa mahdollisimman nopeasti ja *hsp*-geenien vasteen ei olisi pitänyt nousta huomattavasti (Palmisano 200; Iwama 2004). Kalojen *hsp*-geenien ei kuitenkaan pitäisi reagoida herkästi näytteenotosta ja käsittelystä johtuvaan stressiin (Palmisano ym. 2000; Iwama 2004). On myös mahdollista, että kokeeseen valitut geenit eivät kuvastaneet happistressiä ja että tuloksia olisi nähty muussa kuin lihaskudoksessa, sillä *hsp*-geenien ilmenemisessä on kudskohtaisia eroja (Palmisano ym. 2000, Ojima 2007).

Viileässä vedessä triploidien ja diploidien kalojen *hsp*-geenien ilmenemisessä ei odotetusti havaittu eroja, mutta mielenkiintoisesti kasvuodotusta huonommin kasvaneet diploidit kalat ilmensivät enemmän *hsp30*-geeniä. Allaskohtaista kasvuodotusta ja *hsp*-geenejä voidaankin mahdollisesti käyttää dominanssista johtuvan stressin tutkimiseen.

Lämpöstressikokeessa saadut tulokset olivat osittain yllättäviä, sillä toisissa kokeissa stressaavat tilanteet ovat aiheuttaneet triploidien kalojen kuolleisuutta (Galbreath & Thorgaard 1995; Ojolick 1995). Kuitenkin on myös tutkimuksia, joissa erot triploidien ja diploidien kalojen lämpöstressivasteissa ovat olleet pieniä tai niitä ei ole ollut lainkaan (Galbreath 2006). Aikaisempien tutkimustulosten ristiriitaisuutta voivat osittain selittää triploidian indusoitumiseen käytetyt erilaiset menetelmät, jotka ovat voineet aiheuttaa polyploidiaan liittymättömiä eroja tutkimustulosten välille (Malison ym. 1993). Tässä kokeessa käytetyt diploidit kalat olivat triploidisaatiokäsittelystä diploideiksi jääneitä kaloja, mikä pienensi triploidisaatiokäsittelystä mahdollisesti johtuvaa harhaa. On silti epäselvää onnistuttiinko kokeessa aiheuttamaan kirjolohille mittavaa happistressiä, mutta tulokset viittaisivat siihen, että triploidit kalat selviytyvät

pitkäkestoisesta lämpöstressissä yhtä hyvin kuin diploidit. Tulosten mukaan ainakaan lievä happistressi ei heikennä triploidien kalojen selviytymistä pitkäkestoisesta lämpöstressistä.

## 7. LÄHDELUETTELO

- Allen SK, 1983. Flow cytometry: assaying experimental polyploidy in fish and shellfish. *Aquaculture* 33: 317–328.
- Arai K, 2001. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture* 197: 205–228.
- Atkins ME & Benfey TJ, 2008. Effect of acclimation temperature on routine metabolic rate in triploid salmonids. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 149: 157-161.
- Basu N, Todgham AE, Ackerman PA, Bibeau MR, Nakano K, Schulta PM & Iwama GK, 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene* 295:173-183.
- Benfey TJ & Biron M, 2000. Acute response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture* 184: 167–176.
- Benfey TJ, McCabe LE & Pepin P, 1997. Critical thermal maxima of diploid and triploid brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Environ Biol Fishes* 49: 259-264.
- Benfey, TJ & Sutterlin AM, 1984. Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 36: 359–367.
- Blanc JM & Maunas p, 2005. Farming evaluation of the ‘brownbow’ triploid hybrid (*Oncorhynchus mykiss* x *Salmo trutta*). *Aquac Int* 13: 271-281.
- Blanc JM, Maunas P & Vallée F, 2005. Effect of triploidy on paternal and maternal variance components in brown trout, *Salmo trutta*. *Aquac Res* 36: 1026–1033.
- Bonnet S, Haffray P, Blanc JM, Vallée F, Vauchez C, Faure A & Fauconneau B, 1999. Genetic variation in growth parameters until commercial size in diploid and triploid freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and seawater brown trout (*Salmo trutta*). *Aquaculture* 173: 359–375.
- Budiño B, Cal RM, Piazon C & Lamas J, 2006. The activity of several components of the innate immune system in diploid and triploid turbot. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 145: 108–113.
- Chevassus B, Guyomard R, Chourrout D & Quillet E, 1983. Production of viable hybrids in salmonids by triploidisation. *Genet Sel Evol* 15: 519-532.

- Ching B, Jamieson S, Heath JW, Heath DD & Hubberstey A, 2009. Transcriptional differences between triploid and diploid Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during the live *Vibrio anguillarum* challenge, *Heredity* 104: 224-234.
- Chourrout D, Chevassus B, Krieg F, Happe A, Burger G & Renard P, 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females—potential of tetraploid fish. *Theor Appl Genet* 72: 193–206.
- Cotter D, O'Donovan V, Drumm A, Roche N, Ling EN & Wilkins NP, 2002. Comparison of fresh water and marine performances of all-female diploids and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquac Res* 33: 43–53.
- Deane EE & Woo NYS, 2011. Advances and perspectives on the regulation and expression of piscine heat shock proteins. *Rev Fish Biol Fisheries* 21: 153-185.
- Devlin RH, Sundström LF & Muir WM, 2006. Interface of biotechnology and ecology for environmental risk assessments of transgenic fish. *Trends Biotechnol* 24: 89-97.
- Ellis T, North B, Scott AP, Bromage NR, Portet M & Gadd D, 2002. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *J Fish Biol* 61: 493 -531.
- Environment Agency, 2009. National trout & grayling fisheries strategy. New rules to protect wild brown trout. Environment Agency, UK.
- Felip A, Zanuy S, Carrillo M, Martínez G, Ramos J & Piferrer F, 1997. Optimal conditions for the induction of triploidy in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 152: 287–298.
- Felip A, Piferrer F, Carrillo M & Zanuy S, 2001a. Comparative growth performance between diploid and triploid sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) over the first four spawning seasons. *J Fish Biol* 58: 76–88.
- Felip A, Zanuy S, Carrillo M & Piferrer F, 2001b. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica* 111: 175–195.
- Fjellidal P & Hansen T, 2010. Vertebral deformities in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) underyearling smolts. *Aquaculture* 309: 131-136.
- Frazer TWK, Fjellidal PG, Hansen T & Mayer I, 2012a. Welfare Considerations of Triploid Fish. *Res Fish Sci* 20: 192-211.
- Frazer TWK, Fjellidal PG, Skjæraasen JE, Hansen T & Mayer I, 2012b. Triploidy alters brain morphology in pre-smolt Atlantic salmon *Salmo salar* : possible implications for behaviour. *J Fish Biol* 81: 2199-2221.

- Friars GW, McMillan I, Quinton VM, O'Flynn FM, McGeachy SA & Benfey TJ, 2001. Family differences in relative growth of diploid and triploid Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquaculture* 192: 23–29.
- Galbreath PF & Thorgaard GH, 1995. Saltwater performance of all female triploid Atlantic salmon. *Aquaculture* 138: 77–85.
- Galbreath PF, Adams ND, Sherrill LW & Martin TH, 2006. Thermal tolerance of diploid versus triploid rainbow trout and brook trout assessed by time to chronic lethal maximum. *Env Biol Fishes* 75: 183–193.
- Galbreath PF, St Jean W, Anderson V & Thorgaard GH, 1994. Freshwater performance of all-female diploid and triploid Atlantic salmon. *Aquaculture* 128: 41–49.
- Garner SR, Madison BN, Bernier NJ & Neff BD, 2008. Juvenile growth and aggression in diploid and triploid Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *J Fish Biol* 73:169-185.
- Gillet C, Vauchez C & Haffray P, 2001. Triploidy induced by pressure shock in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): growth, survival and maturation until the third year. *Aquat Living Resour* 14: 327–334.
- Gong Z, Ju B & Wan H, 2001. Green fluorescent protein (GFP) transgenic fish and their applications. *Genetica* 111: 213-225.
- Hershberger W & Hostuttler M, 2005. Variation in time to first cleavage in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* embryos: a major factor in induction of tetraploids. *J World Aquac Soc* 36: 96-102.
- Hussain MG, Rao GPS, Humayun NM, Randall CF, Penman DJ, Kime D, Bromage NR, Myers JM & McAndrew BJ 1995. Comparative performance of growth, biochemical composition and endocrine profiles in diploid and triploid tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 138: 87-97.
- Hyndman CA, Keiffer JD & Benfey TJ, 2003a. Physiology and survival of triploid brook trout following exhaustive exercise in warm water. *Aquaculture* 221: 629–643.
- Hyndman CA, Kieffer JD & Benfey TJ, 2003b. The physiological response of diploid and triploid brook trout to exhaustive exercise. *Comp Biochem Physiol Part A* 134, 167–179.
- Iwama GK, Afonso LOB, Todgham A, Ackerman P & Nakamo K, 2004. Are *hsps* suitable for indicating stressed states in fish? *J Exp Biol* 207: 15-19.
- Johnson RM, Shrimpton JM, Cho GK & Heath DD, 2007. Dosage effects on heritability and maternal effects in diploid and triploid Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Heredity* 98: 303-310.

- Johnston, IA, Strugnell G, McCracken ML, Johnstone R, 1999. Muscle growth and development in normal-sex-ratio and all-female diploid and triploid *Atlantic salmon*. *J Exp Biol* 202: 1991–2016.
- Kalbassi MR, Dorafshan S, Pourkazemi & Amiri, 2009. Triploidy induction in the Caspian salmon, *Salmo trutta caspius*, by heat shock. *J Appl Ichthyol* 25: 104-107.
- Keefe RA & Benfey TJ, 1999. Comparative growth and food consumption of diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*) monitored by radiography. *Aquaculture* 175: 111-120.
- Langston AL, Johnstone R & Ellis, 2001. The kinetics of the hypoferraemic response and changes in levels of alternative complement activity in diploid and triploid Atlantic Salmon, following injection of lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology* 11: 333-345.
- Lamatsch DK, Steinlein C, Schmid m & Scharlt, 2000. Noninvasive Determination of Genome Size and Ploidy Level in Fishes by Flow Cytometry: Detection of triploid *Poedilia Formosa*. *Cytometry* 39: 91-95.
- Lecommandeur D, Haffray P & Philippe L, 1994. Rapid flow cytometry method for ploidy determination in salmonoid eggs. *Aquac Res* 25: 345-350.
- Leclerc E, Taylor JF, Fison D, Fjelldal PG, Diez-Padrisa M & Migaud H, 2011. Comparative seawater performance and deformity prevalence in out-of-season diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolts. *Comp Biochem Physiol A* 158 : 116-125.
- Legatt RA & Iwama GK, 2003. Occurrence of polyploidy in the fishes. *Rev Fish Biol Fish* 13: 237–246.
- Linhart O, Haffray P, Ozouf-Costaz C, Flajšhans M & Vandeputte M, 2001. Comparison of methods for hatchery-scale triploidisation of European Catfish (*Silurus glanis* L.). *J Appl Ichthyol* 17: 247–255.
- Malison JA, Kayes TB, Held JA, Barry TP & Amundson CH, 1993. Manipulation of ploidy in yellow perch (*Perca flavescens*) by heat shock, hydrostatic pressure shock and spermatozoa inactivation. *Aquaculture* 110: 229–242.
- Maxime V, 2008. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish Fish* 9: 67-78.
- Morris MRJ, Fraser DJ, Heggelin AJ, Whoriskey FG, Carr JW, O’Neil SF & Hutchings JA, 2008. Prevalence and recurrence of escaped farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in eastern North American rivers 65: 2807-2826.
- Myers JM & Hershberger WK, 1991. Early growth and survival of heat-shocked and tetraploid-derived triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 96: 97–107.

- Nousiainen AN & Granlund LJ, 2011. Polyploidisten kirjolohien (*Oncorhynchus mykiss*) tuottaminen ja polyploidian toteaminen punasoluanalyseillä. Biotieteiden tutkimusprojektin loppuraportti 28s., Biotieteiden laitos, Itä-Suomen yliopisto, Kuopio.
- Ojima N, Yamashita M & Watabe S, 2005. Comparative expression analysis of two paralogous Hsp70s in rainbow trout cells exposed to heat stress. *Biochim Biophys Acta* 1681: 99-106.
- Ojima N, Yamashita M & Watabe S, 2005. Quantitative mRNA expression profiling of heat-shock protein families in rainbow trout cells. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 51-57.
- Ojima N, 2007. Rainbow trout *hspb1* (*hsp27*): Identification of two mRNA splice variants that show predominant expression in muscle tissues. *Comp Biochem Physiol Part B* 148: 277-285.
- Ojolick EJ, Cusack R, Benfey TJ & Kerr SR, 1995. Survival and growth of all-female diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at chronic high temperature. *Aquaculture* 131: 177-187.
- O'Keefe RA & Benfey TJ, 1997. The feeding response of diploid and triploid Atlantic salmon and brook trout. *J Fish Biol* 51: 989-997.
- Oppedal F, Taranger GL & Hansen T, 2003. Growth performance and sexual maturation in diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in sea water tanks exposed to continuous light or simulated natural photoperiod. *Aquaculture* 220: 145-162.
- Pala I, Coelho MM & Scharl M, 2008. Dosage Compensation by Gene-Copy Silencing in a Triploid Hybrid Fish. *Curr Biol* 18: 1344-1348.
- Palmisano AN, Winton JR & Dickhoff WW, 2000. Tissue-Specific Induction of *Hsp-90* mRNA and Plasma Cortisol Response in Chinook Salmon Following Heat Shock, Seawater Challenge, and Handling Challenge. *Mar Biotechnol* 2: 329-338.
- Pandian TJ & Koteeswaran R, 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* 384: 167-243.
- Peruzzi S & Chatain B, 2000. Pressure and cold shock induction of meiotic gynogenesis and triploidy in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: relative efficiency of methods and parental variability. *Aquaculture* 189: 23-37.
- Perruzi, S, Chatain B, Saillant E, Haffray P, Menu B & Falguière JC, 2004. Production of meiotic gynogenetic and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: 1. Performances, maturation and carcass quality. *Aquaculture* 230: 41-64.

- Piferrer F, Beaumont A, Falguière J, Flajšhans M, Haffray P & Colombo L, 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293: 125-156.
- Poontawee K, Werner C, Mueller-Belecke A, Hoerstgen-Schwark G & Wicke M, 2007. Flesh qualities and muscle fiber characteristics in triploid and diploid rainbow trout. *J Appl Ichthyol* 23: 273–275.
- Regost C, Arzel J, Cardinal M, Laroche M & Kaushik SJ, 2001. Fat deposition and flesh quality in seawater reared, triploid brown trout *Salmo trutta* as affected by dietary fat levels and starvation. *Aquaculture* 193: 325-345.
- Roberts RJ, Agius C, Saliba Cm Bossier P & Sung YY, 2010. Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *J Fish Dis* 33: 789-810.
- Räsänen K, Arsiola T & Oikari A, 2012. Fast Genomic Biomarker Responses of Retene and Pyrene in Liver of Juvenile Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Bull Environ Contam Toxicol* 89: 733-738.
- Sacobie CFD, Glebe BD, Barbeau MA, Lall SP & Benfey TJ, 2012. Effect of strain and ploidy on growth performance of Atlantic Salmon, *Salmo salar*, following seawater transfer. *Aquaculture* 334-337: 58-64.
- Sadler J, Pankhurst PM & King HR, 2001. High prevalence of skeletal deformity and reduced gill surface area in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 198: 369–386.
- Sadler J, Pankhurst PM, Pankhurst NW & King H, 2000a. Physiological stress responses to confinement in diploid and triploid Atlantic salmon. *J Fish Biol* 56: 506-518.
- Sadler J, Wells RMG, Pankhurst PM, Pankhurst NW, 2000b. Blood oxygen transport, rheology and haematological responses to confinement stress in diploid and triploid Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 349-361.
- Snekser JL, McRobert SP, Murphy CE & Clotfelter ED, 2006. Aggregation Behaviour in Wildtype and Transgenic Zebrafish. *Ethology* 112: 181-187.
- Taylor JF, Needham MP, North BP, Morgan A, Thompson K & Migaud H, 2007. The influence of ploidy on saltwater adaptation, acute stress response and immune function following seawater transfer in non-smolting rainbow trout. *Gen Comp Endocr* 152: 314-325.
- Taranger GL, Carrilo M, Schultz RW, Fontaine P, Zanuy S, Felip A, Weltzien F, Dufour S, Karlsten Ø, Noberg B, Andersson E & Hansen T, 2010. Control of puberty in farmed fish. *Gen Comp Endocr* 165: 483-515.



- Thorgaard GH, Rabinovitch PS, Shen MW, Gall GAE, Propp J & Utter FM, 1982. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. *Aquaculture* 29: 305–309.
- Thorgaard GH, Arbogast DN, Hendricks JD, Pereira CB & Bailet GS, 1999. Tumor suppression in triploid trout. *Aquat Toxicol* 46: 121-126.
- Thorpe JE, 2004. Life history responses of fishes to culture. *J Fish Biol* 65 (Suppl. A), 263–285.
- Tiwary BK, Kirubakaran R & Ray AK, 2004. The biology of triploid fish. *Rev Fish Biol Fish* 14: 391–402.
- Utter FM, Johnson OW, Thorgaard GH & Rabinovitch PS, 1983. Measurement and potential applications of induced triploidy in Pacific salmon. *Aquaculture* 35: 125–135.
- Weber GM & Hostuttler MA, 2012. Factors affecting the first cleavage interval and effects of parental generation on tetraploid production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 344-349: 231-238.
- Withler RE, Beacham TD, Solar II & Donaldson EM, 1995. Freshwater growth, smolting, and marine survival and growth of diploid and triploid coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 136: 91–107.
- Withler RE, Clarke WC, Blackburn J & Baker I, 1998. Freshwater growth, smolting, and marine survival and growth of diploid and triploid coho salmon ( *Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 168: 413-422.
- Xu J, You F, Wu X, Zhang P, Lin Y, Jiang H & Zheng C, 2008. Induction of triploidy in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* (Richardson, 1846): effects of pressure shocks and growth performance in the first rearing year. *Aquac Res* 39: 1369–1376.
- Youngson AF, Dosdat A, Saroglia M & JordanWC, 2001. Genetic interactions between marine finfish species in European aquaculture and wild conspecifics. *J Appl Ichthyol* 17: 153–162.
- Zhang XL & Onozato H, 2004. Hydrostatic pressure treatment during the first mitosis does not suppress the first cleavage but the second one. *Aquaculture* 240: 101–113.