

TRIPLOIDISTEN SIIKOJEN (*Coregonus lavaretus*) TUOTTAMINEN HYDROSTAATTISEN
PAINEN AVULLA JA POLYPLOIDIA-ASTEEN MÄÄRITTÄMINEN
VIRTAUSSYTOTOMETRIALLA

Antti Nousiainen
Pro gradu -tutkielma
Biotieteiden koulutusohjelma / Biotekniikan pääaine
Itä-Suomen yliopiston Biotieteiden laitos
Heinäkuu 2012

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta

Biotieteiden koulutusohjelma, Biotekniikan pääaine

NOUSIAINEN, ANTTI NIKOLAI: Triploidisten siikojen (*Coregonus lavaretus*) tuottaminen hydrostaattisen paineen avulla ja polyploidia-asteen määrittäminen virtaussytometrialla

Pro gradu -tutkielma 54 sivua, 2 Liitettä (10 sivua)

Ohjaajat: Tiina Arsiola (FT), Heikki Koskinen (FM) ja Jouni Heikkinen (FM)

Heinäkuu 2012

Avainsanat: siika, triploidia, paineshokki, virtaussytometria, punasolu

TIIVISTELMÄ

Triploideja kaloja tuotetaan vesiviljelyssä ensisijaisesti niiden steriiliyden takia, jonka ansiosta triploidien kalojen lihanlaatu on hyvä ympäri kasvukauden. Vaikka siika (*Coregonus lavaretus*) on toiseksi tärkein viljelty ruokakala Suomessa, sen bioteknologiset sovellukset ovat vasta kehittymässä. Tässä pro gradu -tutkielmassa kehitettiin menetelmä triploidisten siikojen tuottamiseksi hydrostaattisen paineen avulla. Tavoitteena oli löytää mahdollisimman hyvän triploidiasaannon sekä elävyyden tuottava käsittely. Triploidisten siikojen tuottamisesta ei ole aiempaa tieteellistä julkaistua tutkimustietoa.

Tutkimuksessa käytettiin neljää asteminuuttiryhmää (100, 200, 300, 400 °Cmin) kolmena rinnakkaisena (A-C) ja verrattiin kahta eri paineshokkia (9000 ja 10 000 psi). Käsittelyryhmiä oli yhteensä 24 ja kontrolliryhmiä oli 1. Aineistona käytettiin Kokemäenjoen vaellussiian 6–vuotiaiden naaraiden mätiä ja 5-vuotiaiden koiraiden maitia, jotka saatiin Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen Tervon toimipaikasta. Mädin haudonnan, poikasten kuoriutumisen ja 3 kuukauden kasvatuksen jälkeen sioilta otettiin terminaaliverinäytteet, jotka pakastettiin (-20 °C). Lisäksi kaloista mitattiin pituudet, painot, elävyydet ja mahdolliset epämuodostumat. Triploidian määrittäminen toteutettiin virtaussytometrialla siikojen pakastetuista verinäytteistä ja analyysit tehtiin kahdesti kullekin näytteelle. Ensimmäisellä ajokerralla tutkittiin yhteensä 250 näytettä ja toisella ajokerralla näistä 213 näytettä. Tilastolliset analyysit käsittelyryhmien vertailuista tehtiin Kruskal-Wallis testillä ja merkitsevät erot ilmoitettiin $p < 0,01$.

Kokonaisuutena korkeimmat triploidia-asteet saatiin ryhmillä 100-300 °Cmin paineella 9000 psi (triploidia-aste välillä 77-100 %). Näitä asetuksia voisi harkita triploidisten siikojen tuottamiseen. Painemäärien vertailussa vakaampia tuloksia saatiin paineella 9000 psi. Triploidia-asteissa oli yleisesti hajontaa ensimmäisen ja toisen ajokerran välillä, mikä johtui todennäköisesti näytteiden pakastuksesta (-20 °C). Korkeimmat keskipituudet ja -painot olivat ryhmissä 100-300 °Cmin paineella 10 000 psi ja alhaisimmat ryhmässä 400 °Cmin paineella 10 000 psi (ero ryhmien välillä: $p < 0,01$). Ryhmienväliset erot sekä pituuksissa että painoissa johtuivat alhaisesta elävyydestä kaikissa ryhmissä. Eniten kaloja oli elossa kontrolliryhmässä (22 %). Käsittelyryhmistä korkein elävyys oli ryhmässä 300 °Cmin paineella 10 000 psi ($5,6 \pm 2,9$ %) ja alhaisin ryhmässä 400 °Cmin paineella 10 000 psi ($0,7 \pm 0,3$ %) (ero ryhmien välillä: $p < 0,01$). Ryhmien alhainen elävyys johtui todennäköisesti normaalia heikkolaatuisemmasta siianmädistä. Epämuodostumista havaittiin ainoastaan selkärangan skolioosia, jota oli eniten ryhmässä 300 °Cmin paineella 10 000 psi ($5,4 \pm 4,8$ %) ja ero kontrolliryhmään (3,1 %) oli merkitsevä ($p < 0,01$).

Mahdolliset jatkotutkimukset voisivat keskittyä paineshokkikäsittelyjen optimointiin, vaihtoehtoisten menetelmien vertailuun triploidisten siikojen tuottamiseksi sekä polyploidia-asteen määrittämenetelmien kehittämiseen.

Keywords: European whitefish, triploidy, pressure shock, flow cytometry, erythrocyte

ABSTRACT

Triploid fish are produced in aquaculture primarily because of their sterility, which enables high quality meat throughout growing season. Although European whitefish (*Coregonus lavaretus*) is the second most important cultured fish in Finland, its biotechnological applications are still emerging. In this Master's thesis we developed a novel method for producing triploid whitefish with hydrostatic pressure. The objective was to find the best possible treatment that provided the highest triploid and survival yields. There are no previous scientific publications about the production of triploid whitefish.

In this experiment we used four degree minute groups (100, 200, 300, 400 °Cmin) in triplicate (A-C) and compared two different pressureshocks (9000 and 10 000 psi). There were a total of 24 treatment groups and 1 control group. We used Kokemäki River whitefish eggs from 6-year old females and milt from 5-year old males. The eggs and milt were provided by Finnish Game and Fisheries Research Institute Tervo unit. After the incubation of eggs, hatching and 3-month growth of the fish, terminal blood samples were collected and the samples were frozen (-20° C). In addition we measured the lengths, weights, survival yields and possible deformities of the fishes. The detection of triploidy was assessed with flow cytometry (FCM) from the frozen blood samples. Each sample was analyzed twice by FCM. In the first part we analyzed 250 samples and in the second part 213 samples. The statistical analyses of the treatment groups were performed with Kruskal-Wallis's test and the significant differences were marked with $p < 0,01$.

Overall, the highest triploid yields were obtained in the groups 100-300 °Cmin with 9000 psi (triploid yields 77-100 %). These settings could possibly be used for the production of triploid whitefish. In the comparisons of the pressures, more stable results were obtained with 9000 psi. There was deviation in the triploid yields between the first and second parts of FCM-analyses, probably due to the storage (-20° C) of the samples. The largest average lengths and weights were in the groups 100-300 °Cmin with 10 000 psi and the lowest in the group 400 °Cmin with 10 000 psi (difference between groups: $p < 0,01$). The differences between groups in average lengths and weights in this experiment were due to low survival in all groups. The highest survival was in the control group (22 %). In treatment groups, the highest survival was in 300 °Cmin with 10 000 psi ($5,6 \pm 2,9$ %) and the lowest in group 400 °Cmin with 10 000 psi ($0,7 \pm 0,3$ %) (difference between groups: $p < 0,01$). The overall low survival in all groups was due to a likely inferior quality of whitefish eggs. From the deformities we observed only scoliosis of the spine, which was the highest in the group 300 °Cmin with 10 000 psi ($5,4 \pm 4,8$ %) and the difference was significant ($p < 0,01$) compared to the control group (3,1 %).

Possible future research could focus on the optimization of the pressure shocks and comparisons of alternative methods for triploid whitefish production as well as developing the analytical methods for polyploid detection.

ESIPUHE

Tämä pro gradu -tutkielma tehtiin Itä.-Suomen yliopiston Biotieteiden ja Biologian laitoksella, Kuopion kampuksella vuosien 2010 ja 2012 välillä. Työ toteutettiin yhteistyössä Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen Tervon toimipaikan kanssa.

Haluan kiittää Kuopion Luonnon Ystävien Yhdistystä tuesta.

Suuret kiitokset FT Tiina Arsiolalle, FM Heikki Koskiselle ja FM Jouni Heikkiselle kannustuksesta ja työn ohjaamisesta. Avusta työn toteuttamisessa ja teknisissä yksityiskohdissa kiitän Tervon toimipaikan henkilökuntaa, LuK Lars Granlundia ja laboratoriomestari Sara Wojciechowskia. Suurimmat kiitokset haluan osoittaa perheelleni.

LYHENNELUETTELO

2N = diploidi

3N = triploidi

4N = tetraploidi

°Cmin = asteminuutti

d°C = päiväaste

DNA = deoksiribonukleiinihappo

EDTA = etyleenidiamiinitetraetikkahappo

EtOH = etanoli

FCM = virtaussytometria

MPa = megapascal

MS-222 = trikaiini metyyli sulfonaatti

MTT = Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus

NaHCO₃ = natriumbikarbonaatti

PBS = fosfaattipuskuroitu suolaliuos

PI = propidiumjodidi

psi = paunaa / neliötuumaa

RKTL = Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	7
2. KIRJALLISUUSKATSAUS	9
2.1 Triploidisten kalojen tuottaminen	9
2.1.1 Paineshokki	11
2.1.2 Lämpötilashokki	12
2.1.3 Kemiallinen shokki	13
2.1.4 Tetraploidien käyttö triploidisten kalojen tuottamiseen	13
2.2 Triploidian vaikutukset kaloihin	14
2.2.1 Kasvu.....	14
2.2.2 Lisääntyminen	16
2.2.3 Selviytyminen ja stressinkesto	18
2.2.4 Käyttäytyminen	20
2.3 Triploidian toteaminen.....	21
2.4 Siikatuotanto vesiviljelyssä.....	23
2.5 Triploidisaation tulevaisuudet mahdollisuudet ja haasteet vesiviljelyssä.....	24
3. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	26
4. AINEISTO JA MENETELMÄT	27
4.1 Kalat ja käsittelyryhmät	27
4.2 Mädin hedelmöitys ja paineshokkikäsittely	29
4.3 Mädin haudonta, poikasten kuoriutumisen ja kasvu	29
4.4 Verinäytteenotot.....	31
4.5 Virtaussytometria.....	32
4.6 Tilastollinen käsittely	33
5. TULOKSET	34
5.1 Keskipituus ja keskipaino, elävyys ja epämuodostumat	35
5.2 Triploidia-aste	38
6. POHDINTA	41
6.1 Paineshokkikäsittelyjen vaikutukset kalojen morfologiaan ja elävyyteen	41
6.2 Paineshokkikäsittelyjen vaikutukset kalojen triploidia-asteeseen	42
6.3 Yhteenveto	44
7. LÄHDELUETTELO	45
LIITTEET	55

1. JOHDANTO

Polyploidialla tarkoitetaan kromosomiston kertautumista (Piferrer ym. 2009) ja sitä tavataan yleisesti kasvikunnassa (mm. siemenettömät hedelmät) sekä alemmilla selkärangkaisilla, kuten kaloilla ja sammakkoeläimillä (Stöck ym. 2002). Polyploidit eliöt voivat muodostua lajin sisällä yksilöille tapahtuvien meioottisten tai mitoottisten muutosten takia (autopolyploidia) tai lajienvälisessä lisääntymisessä (allopolyploidia) (Piferrer ym. 2009). Spontaania polyploidiaa on esiintynyt kalojen evoluutiossa ja eniten alkukantaisissa ryhmissä (Leggatt & Iwama 2003). Taloudellisesti tärkeät lajit, kuten karppi (*Cyprinus carpio*), lohi (*Salmo salar*) ja sampi (*Acipenser sturio*) ovat kehittyneet polyploidisista esi-isistä.

Polyploidia voidaan aiheuttaa keinotekoisesti esimerkiksi kalojen hedelmöitettyjen mätimunien paine- tai lämpöshokkikäsittelyillä (Piferrer ym. 2009). Vesiviljelyn kannalta tärkeimmät polyploidiset kalat ovat triploideja tai tetraploideja. Triploidien kalojen kromosomisto koostuu kolmesta peruskromosomistosta (Piferrer ym. 2009). Tämä johtaa siihen, että triploidit kalat ovat steriilejä ja myös niiden solut ovat suurempia DNA:n korkeammasta määrästä johtuen. Triploidien kalojen eduksi on arveltu parempia kasvuominaisuuksia, koska triploidit kalat eivät käytä energiaa lisääntymiseen ja sukusolujen tuottamiseen. Toisena etuna on sukukypsyyden aiheuttamien negatiivisten vaikutusten välttäminen, joihin kuuluu mm. lihanlaadun heikkeneminen. Steriiliyden seurauksena triploidien kalojen lihanlaatu säilyy korkealaatuisena, kun taas diploideilla kaloilla lihanlaatu heikkenee lisääntymiskautena. Steriilit kalat ovat potentiaalisia istukkaita mm. virkistyskalastustarpeita varten (Kozfkay ym. 2006). Tästä on etuna, että luonnonkalakannat pysyvät geneettisesti koskemattomina, koska steriilit kalat eivät pysty lisääntymään niiden kanssa. Triploideja lohikaloja, kuten järvitaimenta (*Salmo trutta*), puronieriää (*Salvelinus fontinalis*) ja sen hybridejä sekä nieriää (*Salvelinus alpinus*) käytetään istutuksissa urheilukalastuksen tarpeisiin Ranskassa, Englannissa, Saksassa ja Itävallassa (Piferrer ym. 2009).

Triploideja kaloja tuotetaan antamalla hedelmöitettyille mätimunille shokki juuri ennen ensimmäistä solunjakautumista. Yleisimmät tavat polyploidian aiheuttamiseen ovat lämpö-, kylmä- ja paineshokki. Triploideja kaloja voidaan tuottaa myös esimerkiksi risteyttämällä tetraploideja naaraita diploidien koiraiden kanssa. Tetraploideilla kaloilla on kaksinkertainen kromosomisto verrattuna diploideihin kaloihin ja ne ovat lisääntymiskykyisiä. Risteytyksen etuna on triploidien kalojen tuottaminen ilman shokkikäsittelyä, jonka on havaittu joissain tapauksissa huonontavan

esimerkiksi kasvutuloksia (Malison ym. 1993). Tetraploidisten emokalakantojen kasvattaminen ja ylläpito on kuitenkin osoittautunut yleisesti vaikeaksi johtuen runsaasta kuolleisuudesta poikasten kuoriutumisessa ja kasvun aikana (Chourrout ym. 1986, Maxime 2008).

Polyploidia-asteen määrittystapoja ovat tuman koon mittaaminen, kromosomimäärän laskeminen solupreparaateista ja DNA:n määrän mittaaminen virtaussytometrialla (Lecommandeur 1994). Virtaussytometria on tarkka ja nopea menetelmä, sillä se mahdollistaa satojen näytteiden analyysin päivässä (Thorgaard ym. 1982; Allen 1983; Piferrer ym. 2009). Näyte otetaan kaloilla yleensä verestä, mutta määriksiä on tehty myös kudoksenäytteistä (Lamatsch ym. 2000; Lecommandeur 1994).

Triploidian keinotekoista aiheuttamista eli triploidisaatiota kokeiltiin ensimmäiseksi kolmipiikeillä (*Gasterosteus aculeatus*) (Swarup 1959). Tämän jälkeen 1980-luvulla polyploidisten kalojen tuottaminen vesiviljelyssä alkoi Englannissa, USA:ssa ja Kanadassa (Piferrer ym. 2009). Tätä seurasi polyploidisten lohikalojen ja pääasiassa kirjolohella (*Oncorhynchus mykiss*) tehdyt tutkimukset Ranskassa, USA:ssa ja Englannissa sekä Atlantin lohella Englannissa ja Norjassa. 1990-luvun loppupuolella triploidisaatiota aloitettiin myös muilla kalalajeilla, mm. meribasseilla (*Dicentrarchus labrax*) ja kultaotsa-ahvenilla (*Sparus aurata*). Euroopan Unionissa triploidien kalojen tuotantoa toteutetaan pääosin lohikaloilla ja äyriäisillä (Tyynenmeren osterit, *Crassostrea gigas*) ja tärkeimpänä triploidina tuotantolajina on kirjolohi (Piferrer ym. 2009). Triploidisten kirjolohien kokonaistuotanto Euroopassa oli vuonna 2009 noin 15 000 tonnia. Fileiden markkinointi on ympärivuotista ja kysyntä on kovaa erityisesti talvella, jolloin normaalien diploidien kalojen lihanlaatu heikkenee. Triploidista kirjolohta viljellään Euroopassa mm. Ranskassa, Englannissa ja Puolassa, ja muualla maailmassa mm. USA:ssa, Kanadassa ja Chiessä (Piferrer ym. 2009).

Triploidisten kalojen tuotantoa on tehty Suomessa ainakin Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen (RKTL) toimesta. Kokonaistilannetta on vaikea arvioida, koska yksityisten kalanviljelijöiden steriilikalatuotannosta ei ole tietoa saatavilla. Tällä hetkellä triploidituotanto- ja tutkimus on keskittynyt RKTL:n Tervon vesiviljely- ja kalantutkimuslaitokselle. Tervon laitoksella menetelmää on optimoitu tuotantolajeista kirjolohelle ja istukaslajeista järvitaimenelle, nieriälle ja harmaanieriälle (*Salvelinus namaycush*). Triploidisten siikojen tuottamisesta ei ole julkaistua tutkimustietoa Suomessa tai maailmalla. Siika on siten uusi kalalaji triploidikalatuotannossa maailmanlaajuisesti.

Tämän pro gradu –tutkielman tavoitteena oli kehittää menetelmä triploidisten siikojen tuottamiseksi hydrostaattisen paineen avulla. Tutkimuksessa käytettiin neljää asteminuuttiryhmää (100, 200, 300, 400 °Cmin) ja verrattiin kahta eri paineshokkia (9000 ja 10 000 psi). Lisäksi määritettiin käsittelyjen vaikutusta siikojen pituuteen, painoon, elävyyteen sekä epämuodostumien esiintyvyyteen. Triploidian määrittäminen tehtiin virtaussytometrialla siikojen pakastetusta verinäytteestä. Päättävänä tavoitteena oli optimoida siialle menetelmä, jolla saavutetaan korkein triploidia-aste ja paras elävyys.

2. KIRJALLISUUSKATSAUS

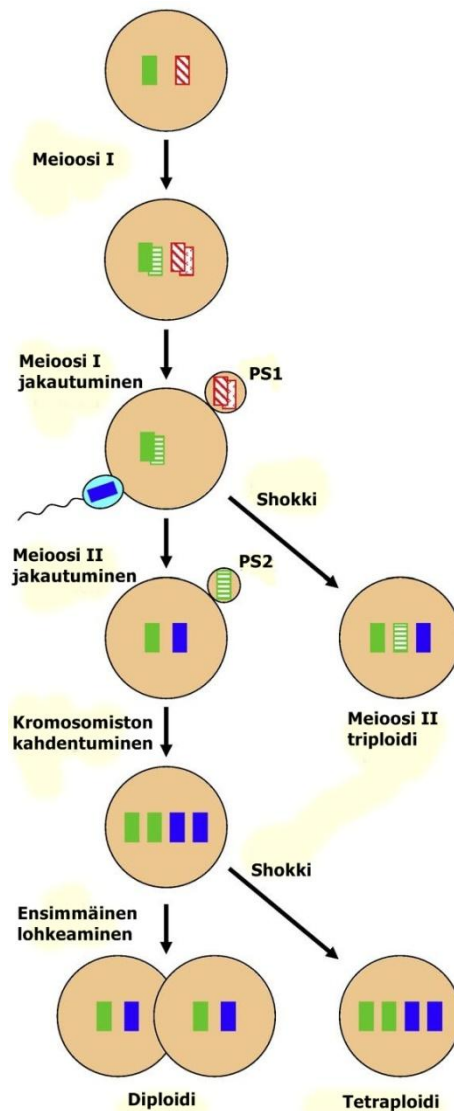
Tämän pro gradu –tutkielman kirjallisuuskatsauksessa keskitytään triploideihin lohikaloihin ja triploidian aiheuttamiin vaikutuksiin kasvussa, lisääntymiskyvyssä, selviytymisessä ja käyttäytymisessä.

2.1 Triploidisten kalojen tuottaminen

Triploidien (3N) kalojen kromosomisto koostuu kolmesta peruskromosomistosta (Piferrer ym. 2009). Triploidit kalat ovat steriilejä ja niiden solut ovat suurempia ja sisältävät enemmän DNA:ta verrattuna diploideihin (2N) kaloihin. Steriiliyden takia triploidit kalat eivät pysty lisääntymään. Spontaanissa triploidiassa steriiliys voi johtua gametogeneesin (sukusolujen muodostuminen) häiriintymisestä ja siten gonadien kehittymättömyydestä. Luonnossa on kuitenkin havaittu poikkeuksia. Esimerkiksi kalalajien välistä risteytymistä voi tapahtua spontaanisti, joka johtaa polyploidisten hybridien syntymiseen (Argue & Dunham 1999).

Triploidisaatio perustuu oikein ajoitettuun shokkiin, joka häiritsee munasolun toista meioottista jakautumista (Piferrer ym. 2009). Vesiviljelyssä käytetään polyploidian aiheuttamiseksi fyysistä tai kemiallista shokkia. Fyysisiin shokkeihin luetaan paine- ja lämpötilashokki, joita käytetään useimmiten kaloille (Ihssen 1990; Pandian & Koteeswaran 1998; Piferrer ym. 2009). Kemiallinen shokki tuotetaan kemikaaleilla. Ennen hedelmöitystä diploidissa munasolussa on tapahtunut naaraan gonadeissa ensimmäinen meioosi, jonka seurauksena munasolun kromosomisto on kahdentunut (Piferrer ym. 2009). Naaraasta vapautuessaan munasolu on toisen meioosin metafaasissa, joka jatkuu hedelmöityksen seurauksena. Hedelmöityksessä puolet maternaalisesta kromosomistosta siirtyy toiseen poistosoluun (PS2) (Kuva 1). Fyysinen tai kemiallinen shokki toisen meioosin aikana

estää toisen poistosolun muodostumista, mutta sallii samanaikaisen maternaalisen kromosomiston jakautumisen. Triploidisaation lopputuloksena syntyy munasoluja, joilla on kolme kromosomistoa - kaksi maternaalista ja yksi paternaalinen (Kuva 1).



Kuva 1. Polyploidian aiheuttaminen kaloissa. Naaraasta vapautuessaan mätimunat ovat toisen meioosin metafaasissa, joka jatkuu hedelmöityksen seurauksena. Triploidisaatiossa shokki häiritsee toisen meioosin jakautumista eli tasausjakoa, jolloin toisen poistosolun (PS2) muodostuminen estyy. Tämän seurauksena syntyy triploideja (3N) munasoluja. Tetraploidisaatiossa kromosomiston kahdentumisen jälkeen annetun shokin seurauksena muodostuu tetraploideja (4N) munasoluja. (Lähde: Piferrer ym. 2009).

Shokkia annettaessa kolme tärkeintä muuttujaa ovat shokin aloitusaika hedelmöityksen jälkeen, shokin intensiteetti ja shokin kesto (Felip ym. 1997). Tärkein muuttuja on shokin oikea ajoitus

hedelmöityksen jälkeen. Jos shokki annetaan toisessa anafaasissa tai myöhemmin, toista meioottista jakautumista ei voida pysäyttää (Ihssen ym. 1990). Steriilikalatuotannossa käsittelymenetelmä tulee optimoida näiden muuttujien suhteen lajikohtaisesti, sillä yhtenäistä ja kaikille lajeille sopivaa protokollaa ei ole olemassa (Piferrer ym. 2000; Piferrer ym. 2003).

Alkionkehitys kaloilla riippuu ratkaisevasti veden lämpötilasta. Kylmässä vedessä kehitys on hitaampaa, mutta korkeampi lämpötila nopeuttaa alkionkehitystä. Esimerkiksi siialla kutuaika sijoittuu loppusyksyyn Suomessa. Vesien viilentyessä talven aikana alkionkehitys hidastuu ja vasta keväällä veden lämpötilan noustessa kehitys kiihtyy. Tällä tavalla luonnossa poikasten kuoriutuminen ei tapahdu liian aikaisin. Kirjallisuudessa raportoidaan usein shokkikäsittelyjen aikana käytetty veden lämpötila (Piferrer ym. 2009). Shokin aloitusaikaa hedelmöityksen jälkeen voidaan kuvata myös esimerkiksi asteminuuteilla (°Cmin). Asteminuuttimäärä saadaan, kun kerrotaan hedelmöitysmishetkestä kuluneet minuutit veden keskilämpötilalla (O'Keefe & Benfey 1997). Esimerkiksi 100 °Cmin tarkoittaa shokin aloittamista 20 minuutin kuluttua hedelmöityksestä, kun veden lämpötila on + 5 °C.

2.1.1 Paineshokki

Paineshokkia on käytetty lohikaloista mm. Atlantin lohelle (Benfey & Sutterlin 1984; Cotter ym. 2002; Leclercq ym. 2011; Taylor ym. 2011), kirjolohelle (Chourrout ym. 1986; Hershberger & Hostuttler 2007; Loopstra & Hansen 2008), harmaanieriälle (Kozfkay ym. 2005), puronieriälle (Benfey ym. 1993; Schafhauser-Smith 2001) ja pohjanharjukselle (*Thymallus arcticus*) (Loopstra & Hansen 2010), ja muista kalalajeista mm. meribassille (Peruzzi & Chatain 2000; Peruzzi ym. 2004) ja turskalle (*Gadus morhua*) (Ghigliotti ym. 2011). Hedelmöitetyt mätimunat altistetaan hydrostaattiselle paineelle, joka saa aikaan polyploidiaa mätimunissa. Menetelmän vaikutusmekanismia ei tunneta tarkasti. Paineshokin etuna muihin triploidisaatiomenetelmiin on se, että hydrostaattinen paine jakautuu tasaisesti mätimunien kesken (Maxime 2008). Paineshokki toteutetaan laitteistolla, jolla tuotetaan suljettuun vesitilaan hetkittäisesti hyvin korkea hydrostaattinen paine mekaanisen pumpun avulla (Liite 1). Vaikka eri kalalajien mätimunien tilavuuksissa on suuria eroja, sopiva painemäärä on kirjallisuudessa keskimäärin melko samanlainen, välillä 58 - 85 megapascalia (MPa) (Piferrer ym. 2009). Yksi käytetyimmistä painetta kuvaavista yksiköistä MPa:n lisäksi on psi, joka tarkoittaa paunaa/neliötuumaa. Paineikäsitelyksen kesto on 2 - 20 minuuttia riippuen kalalajista. Paineshokilla on saatu vakaammat tulokset ja korkeammat

elävyydet lämpöshokkiin verrattuna (Maxime 2008; Pandian & Koteeswaran 1998). Atlantin lohilla 100 % triploidia-aste saatiin 9500 psi:n (65,5 MPa) paineshokilla, 5 min kestolla, 300 °Cmin hedelmöityksen jälkeen, + 10 °C vedessä (Taylor ym. 2011). Kirjolohilla 100 % triploidia-aste on saavutettu esimerkiksi 9500 psi:n paineshokilla, 5 min kestolla, 400 °Cmin hedelmöityksen jälkeen, + 10 °C vedessä (Loopstra & Hansen 2010).

Tutkimukset paineshokin vaikutuksista kohdelajin fysiologiaan pitkällä aikavälillä ovat vielä vähäisiä (Maxime 2008). Nisäkkäiden soluilla sekä hydrostaattisen paineen että lämpötilan vaihteluiden tiedetään saavan aikaan muutoksia sekä solukalvon molekyyliä (mm. solukalvojen lipidit, proteiinit ja tukiranka) että solukalvoon liittyvissä fysiologisissa toiminnoissa. Kaloilla korkean paineen vaikutuksia on sitä vastoin tutkittu enemmän (esim. Sebert 2002). Esimerkiksi solukalvon juoksevuus pienenee, jos hydrostaattinen paine kasvaa (Maxime 2008). Peruzzin & Chatainin (2000) mukaan paineshokin fysiologiset vaikutukset olivat vähemmän haitallisia verrattuna lämpötilashokin vaikutuksiin triploideilla meribasseilla. Kirjolohella lämpötilashokki aiheutti kohonnutta kuolleisuutta silmäpistevaiheessa ja kuoriutumisen sekä enemmän epämuodostumia kuoriutumisen hetkellä verrattuna paineshokkiin (Haffray ym. 2007). Paineshokilla tuotetuissa triploideissa ei ollut merkittäviä eroja selviytymisessä, kasvussa tai epämuodostumien määrässä diploideihin verrattuna. Tällä hetkellä paineshokki on vesiviljelyn vaatimiin olosuhteisiin toimivin menetelmä kalojen triploidisaatiossa.

2.1.2 Lämpötilashokki

Lämpötilashokki jaetaan lämpö- ja kylmähokkiin. Lämpöshokkia on käytetty mm. lohelle (Galbreath & Thorgaard 1995), kirjolohelle (Thorgaard & Jazwin 1981), puronieriälle (Galbreath & Samples 2000; Galbreath ym. 2006) ja taimenelle (Kalbassi ym. 2009), ja muista lajeista mm. sammelle (*Acipenser baeri* Brandt) (Fopp-Bayat & Woznicki 2006). Kylmähokkia on käytetty mm. puronieriälle (Lemoine & Smith 1980), piikkikampelalle (*Scophthalmus maximus*) (Piferrer ym. 2000; Piferrer ym. 2003; Cal ym. 2010), meribassille (Felip ym. 2009), suutarille (*Tinca tinca* L.) (Flajšhans ym. 2010) ja karppien hybrideille (Luo ym. 2011). Lämpötilashokissa hedelmöitetty mätimunat altistetaan joko lämpimälle tai kylmälle vedelle, mikä saa aikaan polyploidiaa (Piferrer ym. 2009). Perusperiaatteena on käyttää lämpöshokkia kylmänveden kalalajeille ja kylmähokkia lämpimien vesien kalalajeille. Lämpötilashokki voi muuttaa mätimunän kehitysnopeutta, häiritä tumasukkulan mikrotubuluksia tai vaikuttaa solulimaan ja siten estää toisen poistosolun lähtemistä

meioosissa. Sekä lämpö- että kylmähokin kestoajat ovat samaa luokkaa kuin paineshokissa. Lämpöshokissa käytetään 24 - 32 °C vettä kylmänveden lajeille ja 34 - 41 °C vettä lämpimän veden lajeille. Kylmähokissa käytetään -1 – 4 °C vettä lämpimän veden lajeille. Esimerkiksi Flajšhans ym. (2010) tutkimuksessa triploidisia suutareita saatiin tuotettua parhaiten käyttämällä kylmähokissa 0 - 4 °C vettä 5 minuuttia hedelmöityksen jälkeen, inkubointilämmön ollessa 20 °C. Triploidisten lohikalojen tuotannossa käytetään yleensä joko lämpö- tai paineshokkia (Pandian & Koteeswaran 1998). Kylmähokki on toiminut paremmin monneilla (*Siluridae*) ja molemmat lämpötilashokit särkikaloiilla (*Cyprinidae*). Kylmä- ja paineshokki on havaittu yhtä tehokkaiksi pienien mätimunien kalalajeilla, esim. karpeilla, meribasseilla ja piikkikampeloilla. Yleisesti kylmähokilla on saatu parempi selviytymisprosentti verrattuna lämpöshokkiin. Kylmähokilla tuotetut triploidit Niilin tilapiat (*Oreochromis niloticus*) kasvoivat nopeammin verrattuna lämpöshokilla tai paineshokilla tuotettuihin triploideihin Niilin tilapioihin. Tämän perusteella kylmähokki on suotuisampi triploidien kalojen kasvulle varsinkin myöhemmissä kasvuvaiheissa.

2.1.3 Kemiallinen shokki

Polyploidiaa voidaan aiheuttaa vesiviljelyssä myös kemikaaleilla. Kemiallisia aineita käytetään mm. triploidisten merikorvien (*Halotis laevigata*) tuotannossa (Li ym. 2007), mutta vähemmän triploidisten kalojen tuotannossa (Arai 2001). Vesiviljelyssä käytetyimmät kemikaalit ovat sytokalasiini β (Liu ym. 2004) ja 6-dimetyyliaminopuriini (6-DMAP) (Sellars ym. 2006). Sytokalasiini β voi johtaa mosaikismiin kaloissa (Pandian & Koteeswaran 1998), jolloin ploidiaaste vaihtelee kudosten välillä (Arai 2001). Kemikaalien käytössä tärkeää on aineen käytetty pitoisuus, shokin aloitusaika hedelmöityksestä, shokin kesto, veden lämpötila ja mätimunien laatu. Li ym. (2007) havaitsivat tutkimuksessaan, että triploidien merikorvien hedelmöitys- ja kuoriutumisprosentti sekä selviytyminen vähenivät, kun käytettiin suurempia sytokalasiini β -pitoisuuksia. Nykyisin triploideja ostereita tuotetaan Yhdysvalloissa ja Euroopassa lähes kokonaan ilman kemikaaleja risteyttämällä diploideja naaraita ja tetraploideja koiraita (Piferrer ym. 2009).

2.1.4 Tetraploidien käyttö triploidisten kalojen tuottamiseen

Triploideja kaloja voidaan tuottaa ilman aiheutettua shokkikäsittelyä risteyttämällä tetraploideja (4N) ja diploideja kaloja. Tätä on käytetty mm. kirjolohelle (Chourrout ym. 1986; Chourrout & Nakayama 1987), mutakalalle (*Misgurnus mizolepis*) (Nam & Kim 2004), aasianmutakalalle

(*Misgurnus anguillicaudatus*) (Yoshikawa ym. 2008) ja karpille (Luo ym. 2011). Tetraploidien emokalakantojen perustaminen on kuitenkin muodostunut ongelmalliseksi monien tekijöiden takia. Hedelmöityskyky on havaittu heikoksi sekä koirailta että naarailta (Chourrout 1986; Chourrout & Nakayama 1987). Koiraiden huono hedelmöityskyky voi johtua siittiöiden suuremmasta koosta ja siitä johtuvasta vaikeudesta tunkeutua diploideihin mätimunaseluihin. Tetraploideilla on lisäksi havaittu lisääntynyttä kuolleisuutta mm. poikasten kuoriutumisen- ja starttiruokintavaiheessa sekä solujen mosaikismia (Myers & Hershberger 1991; Zou 2004). Pysyviä ja lisääntymiskykyisiä tetraploideja emokalakantoja on saatu tuotettua kirjolohella (Arai 2001), mutakalalla (Yoshikawa ym. 2008) ja jättilahnalla (*Megalobrama amblycephala*) (Piferrer ym. 2009). Tetraploidiset emokalakannat voivat nostaa kokonaiskustannuksia johtuen lisääntyneestä kuolleisuudesta ja ylläpitokuluista. Tämän takia triploidisaatiossa käytetään toistaiseksi yleisemmin shokkikäsittelyjä. Tetraploidien kalojen tuottaminen tapahtuu samalla periaatteella kuin triploidien, mutta aiheutettu shokki annetaan kromosomiston kahdentumisen jälkeen estämällä ensimmäinen solunjakautuminen (Kuva 1).

2.2 Triploidian vaikutukset kaloihin

2.2.1 Kasvu

Triploidian vaikutukset kaloihin ovat aina lajikohtaisia (Piferrer ym. 2009). Vesiviljelyn kannalta tärkeitä osatekijöitä, kuten kasvua, lisääntymiskykyä, selviytymiskykyä ja käyttäytymistä on tutkittu runsaasti ja aiheesta on koottu useita katsausartikkeleita (Pandian & Koteeswaran 1998; Maxime 2008; Piferrer ym. 2009). Johtuen suuremmasta kromosomimäärästä, triploidin kalan solujen tuma on 1,5-kertainen verrattuna diploidin kalan tumaan (Piferrer ym. 2009). Tämän seurauksena triploidin kalan yksittäisen solun koko on myös suurempi. Jos triploideilla kaloilla tapahtuu sama määrä solunjakautumisia kudosten muodostamisessa, kudosten tulisi viedä enemmän tilaa triploideilla kaloilla verrattuna diploideihin (Ihssen ym. 1990). Tämän perusteella triploidit kalat voisivat kasvaa diploideja kaloja nopeammin ja suuremmiksi. Tutkimuksissa on saatu kuitenkin vaihtelevia tuloksia kasvun suhteen. Solut on todettu suuremmiksi triploideissa kaloissa, mutta varsinaisessa kalan koossa ei ole ollut merkittävää eroa diploideihin kaloihin verrattuna (Pandian & Koteeswaran 1998).

Poikasvaiheessa ja ennen oletettua sukukypsyyssikää triploidien kalojen kasvu on havaittu samanlaiseksi tai hitaammaksi diploideihin verrattuna (Piferrer ym. 2009). Myöskään Sheehan ym. (1999) eivät ole havainneet triploideilla kaloilla selvästi parempaa kasvukykyä ennen oletettua sukukypsyyssikää. Toisaalta tuoreessa tutkimuksessa triploideilla Atlantin lohien poikasilla havaittiin diploideihin verrattavaa tai parempaa kasvua kahdessa peräkkäisessä vuosiryhmässä (v. 2007 ja v. 2008), diploidien kalojen ollessa kuitenkin aluksi suurempia starttiruokintavaiheessa (Taylor ym. 2011). Tämä kasvuero diploidien ja triploidien väliltä hävisi kuudessa viikossa, jolloin triploidit kalat olivat kasvaneet suuremmiksi. Lisäksi epämuodostumia havaittiin vähän, eikä ploidia-aste vaikuttanut niiden ilmenemiseen. Triploidien kalojen kasvun on todettu paranevan, kun kalat kasvavat oletettuun sukukypsyyssikään. Tämä on havaittu esimerkiksi kookkailla triploideilla kirjolohilla (Chourrout ym. 1986), puronieriöillä (Boulanger 1991) ja piikkikampeloilla (Cal ym. 2006). Diploidien kalojen kanssa yhteiskasvatuksessa olevat triploidit kalat voivat kasvaa huonommin, johtuen kenties niiden heikommasta aggressiivisuudesta ravinnosta kilpailtaessa (McCarthy ym. 1996). Kasvu tasaantuu, kun diploidit ja triploidit kalat kasvatetaan omissa altaissaan, mikä on havaittu kirjolohilla (Wagner ym. 2006), nierioilla (Gillet ym. 2001) ja meribasseilla (Felip ym. 2001b). Sheehan ym. (1999) tutkimuksissa triploidit täysnaaraskirjolohet kasvoivat paremmin normaaliin diploidiin sekaparveen verrattuna kun taas triploideilla täysnaaraslohilla päinvastaisesti kasvu ei ollut parempaa verrattuna normaaliin sekaparveen (Galbreath & Thorgaard 1995).

Triploidien ja diploidien kalojen morfologia on yleisesti samankaltainen. Silti triploidiaan liitetään usein mm. luuston epämuodostumia (Maxime ym. 2008). Esimerkiksi triploideissa Atlantin lohissa alaleuan epämuodostuma on yleisimmin kuvailtu luuston poikkeavuus (Sadler ym. 2001; Oppedal ym. 2003). Epämuodostumien esiintyvyys triploideilla vaihtelee käytetyn shokkimenetelmän mukaan. Esimerkiksi risteyttämällä tetraploidisia koiraita diploidisten naaraiden kanssa havaittiin myös sama määrä alkion epämuodostumia sekä triploideilla jälkeläisillä että diploidikontrolleilla (Myers & Hershberger 1991). Lämpöshokilla tuotetuilla triploideilla kirjolohilla havaittiin enemmän epämuodostumia silmäpiste- ja kuoriutumisvaiheessa verrattuna paineshokilla tuotettuihin triploideihin (Haffray ym. 2007). Tämä viittaa siihen, että triploideilla havaitut epämuodostumat voivat liittyä ainakin osin käytettyyn shokkimenetelmään eikä varsinaisesti triploidiaan. Diploidien ja triploidien kalojen epämuodostumista ja niiden vaikutuksista vesiviljelyssä on koottu hiljattain kattava katsausartikkeli (Noble ym. 2012).

Triploidien kalojen sukupuolella on vaikutusta kasvuun tietyillä kalalajeilla (Felip ym. 2001b). Esimerkiksi kampela-, meribassi- ja piikkikampelanaaraat kasvavat luonnossa koiraita nopeammin ja tämä trendi on havaittu myös kyseisten kalalajien triploideilla naarailta. Ploidian ja sukupuolen vuorovaikutus peratun kalan saantoon on huomattu useilla lajeilla (Peruzzi ym. 2004). Esimerkiksi lisääntymiskaudella 45 kuukauden iässä triploideilla meribassinaarailta saanto vaihteli välillä 82 - 92 % ja triploideilla koirailta välillä 88 - 90 %. Yleisesti triploideilla meribasseilla oli suurempi saanto kontrolleihin verrattuna ja naarailta saanto oli viisinkertainen verrattuna kontrolleihin. Viskeraalisen rasvan suhteen triploideissa ja diploideissa kirjolohissa ei ollut eroja (Sheehan ym. 1999). Triploideilla kaloilla voi olla pienempi fileen rasvapitoisuus (Peruzzi ym. 2004; Haffray ym. 2005) lisääntymiskauden ulkopuolella.

2.2.2 Lisääntyminen

Aikainen sukukypsyminen on havaittu ongelmalliseksi kalanviljelyssä lohikaloilla (McClure ym. 2007) ja monilla muilla lajeilla (Taranger ym. 2010). Sukukypsyys vaikuttaa haitallisesti kalojen kasvuun, ravinnon hyödyntämiseen, terveyteen ja hyvinvointiin. Esimerkiksi normaalissa sekaparvessa sukukypsyminen aiheuttaa koiraille lihanlaadun (proteiini- ja rasvapitoisuus, väri) heikkenemistä sekä lisääntynyttä kuolleisuutta (Piferrer ym. 2009). Aikainen sukukypsyminen voi myös lisätä riskiä geneettiseen sekoittumiseen luonnonkantojen kanssa esimerkiksi kalankasvattamoista karkaavien kalojen kyseessä ollessa (Naylor ym. 2005). Tästä yhtenä esimerkkinä on tutkimus, jossa kasvatetut turskat lisääntyivät merihäkeissä, minkä seurauksena hedelmöittyneet mätimunat levisivät vuorovesien mukana ympäröivään vuonoon (Jørstad ym. 2008).

Triploidialla on erilaiset vaikutukset naaraiden ja koiraiden lisääntymisfysiologiaan. Triploidit kalat ovat yleisesti steriilejä, minkä takia ne eivät käytä energiaa gonadien kehitykseen ja lisääntymiseen (Piferrer ym. 2009). Triploidia pienentää naaraiden sukurauhasten kokoa ja painoa (Benfey 1999). Tämä johtaa pienempään gonadosomaattiseen indeksiin ja mahdollisesti suurempaan lihanmäärään teurastuksessa. Makroskooppisesti triploidien naaraiden gonadit ovat vaaleampia ja läpinäkyvämpiä verrattuna diploideihin johtuen ruskuaisen puuttumisesta ja sidekudoksen suuremmasta määrästä. Triploidit naaraat tuottavat mätimunia harvoin. Jos näin tapahtuu, mätimunia on vähän ja ne ovat kehittymättömiä ja hedelmöittymiskyvyttömiä (Benfey & Sutterlin 1984; Piferrer ym. 1994; Gillet ym. 2001). Joissain tutkimuksissa on havaittu oosyyttien kypsymistä vanhemmilla triploideilla

kaloilla, esimerkiksi ruostekampeloilla (*Limanda ferruginea*). Triploidien piikkikampeloiden molemmilla sukupuolilla on havaittu myös lisääntynyttä apoptoosia gonadeissa verrattuna diploideihin (Cal ym. 2010), apoptoosin ollessa yleisempää naarailla.

Triploideilla koirailta gonadit voivat kehittyä lähes samankokoisiksi verrattuna diploideihin yksilöihin (Piferrer ym. 2009). Triploidit koiraat pystyvät tuottamaan laimeaa, steriiliä maitia (Kozfkay ym. 2006). Siittiötuotannon puuttumista, toisin sanoen toiminnallista sterilitettä, on todettu useissa vesiviljelyn kannalta tärkeiden kalalajien autotriploideissa koiraisissa – mm. meribassi (Felip ym. 2001c; Peruzzi ym. 2004), kultaotsa-ahven (Haffray ym. 2005) ja nieriä (Gillet ym. 2001). Steriiliyydestä huolimatta triploideille koiraille kehittyy seksuaalisen kypsymisen sekundäärisiä ominaisuuksia (Warrillow ym. 1997), joihin kuuluvat esim. lohilla leuan koukun kehittyminen, kutuasun sekä muut kehonmuutokset (Järvi 1990; Fleming 1996).

Piferrer (2001) totesi, että täydellisen steriiliyden varmistamiseksi triploidisaatioon tulisi yhdistää hormonaalinen täysnaarastekniikka. Tuotettaessa täysnaarasparvia hedelmöitykseen käytetään maitia emokaloista, jotka ovat saaneet lyhyen aikaa mietoa hormonirehua (17 α -metyylitestosteroni) alkuruokintavaiheessa. Käsittelyn ansiosta nämä genotyypiset naaraat tuottavat sukukypsyessään mädin sijasta maitia, jolla hedelmöitettäessä kaikki syntyvät jälkeläiset ovat naaraita (Gomelsky 2003). Yhdistettynä triploidisaatioon täysnaarastekniikan on havaittu olevan hyödyllinen, sillä pelkän triploidisaation avulla tuotettujen steriilien koiraiden tiedetään käytöksellään osallistuvan kutuun ja siten häiritsevän haittaavasti luonnonkantojen lisääntymistä (Piferrer 2001). Vuonna 2009 noin 80 % makean veden kirjolohimarkkinoista Euroopassa perustui diploideihin täysnaaraskantoihin, vaikka naaraat kasvavat annoskalakokoon 10 % hitaammin verrattuna koiraisiin. Piferrer ym. (1994) tuottivat paineshokilla sekaparven triploideja hopealohia (*Oncorhynchus kisutch*), joille tehtiin shokin jälkeen feminisaatio käsittelemällä osa alkioista estradiolilla. Kuuden kuukauden kasvun jälkeen kalojen triploidia-aste oli 100 % virtaussytometrialla analysoituna ja 82 % kaloista oli naaraita gonadien histologisen määrittelyn perusteella. Vaikka käsittelyt lisäsivät kuolleisuutta alkionkehityksen alkuvaiheissa, kuolleisuus tasaantui myöhemmin. Täysnaarastekniikkaa ja sen käyttöä on kuvattu tarkemmin artikkeleissa Hulata 2001, Piferrer ym. 2001 ja Gomelsky 2003.

Felip ym. (2009) tutkivat kylmähokilla aiheutetun triploidian vaikutuksia pidemmällä aikavälillä meribassien lisääntymiskykyyn ja kasvuun. Vanhemmat triploidit meribassit (keski-ikä 7 v.)

säilyttivät heikentyneen lisääntymiskyvyn ja tämä tulos kumosi ajatuksen, että lisääntymiskyky saattaisi iän kasvaessa palata triploideilla meribasseilla. Vanhempien triploidien naaraiden sukurauhaset olivat 182-kertaa pienemmät verrattuna diploideihin samanikäisiin naaraisiin. Vanhempien triploidien koiraiden gonadit olivat kooltaan noin puolet verrattuna samanikäisiin diploidikoiraisiin. Tulokset olivat samankaltaisia kuin nuoremmilla meribasseilla tehdyissä kokeissa (Felip ym. 2001c), vaikutusten ollessa suurempia naarilla (Benfey 1999; Arai 2001; Felip ym. 2001a; Le Comber & Smith 2004; Piferrer ym. 2009). Kasvussa Felip ym. (2009) havaitsivat eroja nuorten (Felip ym. 1999), täysikasvuisten (Peruzzi ym. 2004) ja vanhempien (Felip ym. 2009) triploidisten meribassien välillä. Nuoremmilla ja täysikasvuisilla triploideilla meribasseilla somaattinen kasvu havaittiin samanlaiseksi tai alhaisemmaksi verrattuna diploideihin, mutta Felip ym. (2009) tutkimuksessa vanhemmat ja isommat triploidit meribassit osoittivat parempaa kasvua verrattuna diploideihin. Triploidit naaraat kasvoivat suurimmiksi erityisesti lisääntymiskauden jälkeen, kun taas diploidit menettivät painoaan lisääntymisen aiheuttaman painohävikin johdosta.

2.2.3 Selviytyminen ja stressinkesto

Triploideilla kaloilla on havaittu useissa tutkimuksissa heikompaa elävyyttä mätimunissa, kehittyvissä alkioissa ja starttiruokintavaiheeseen selviytyneissä poikasissa diploideihin kaloihin verrattuna (Ihssen ym. 1990; Pandian & Koteeswaran 1998; Benfey 1999; Arai 2001; Felip ym. 2001a; Hulata 2001; Gomelsky 2003; Tiwary ym. 2004; Maxime 2008). Toisaalta McIntyren (2008) väitöskirjassa triploidien kirjolohien kuolleisuus oli vähäisempää verrattuna diploideihin. McIntyre totesi tulosten olevan päinvastaiset verrattuna muuhun kirjallisuuteen, mutta arvioi syyksi kokeessaan käyttämiä suositusten mukaisia viljelyolosuhteita, joka on voinut parantaa triploidien selviytymistä. McIntyren mukaan aikaisemmissa suorituskyvyn mittaustutkimuksissa olosuhteet ovat voineet olla puutteelliset, mikä on voinut vaikuttaa triploidien heikompaan selviytymiseen diploideihin verrattuna.

Triploidisaation tehokkuuteen vaikuttaa oleellisesti käytetty shokkimenetelmä, shokin aloitusaika hedelmöityksestä sekä shokin intensiteetti ja kesto (Piferrer ym. 2009). Jos protokolla ei ole optimaalinen, osa käsitellyistä kaloista voi jäädä diploideiksi tai seurauksena voi olla lisääntynyttä kuolleisuutta esimerkiksi mädin haudontavaiheessa. Mätimunien laadulla näyttää olevan suurempi merkitys alkioden selviytymiselle kuin varsinaisella ploidia-asteella (Taylor ym. 2011). Jos triploideja kaloja tuotetaan lisääntymiskauden loppupuolella, mätimunien heikko laatu voi vähentää

selviytymistä. Esimerkiksi ylikypsissä mätimunissa havaittiin suurempaa kuolleisuutta verrattuna diploideihin mätimuniin, kun ne altistettiin paineshokille. Toisaalta mädin hedelmöitystä ja poikasten selviytymistä parantavat tekijät, kuten mätimunien rasvahappokoostumus merilajeilla, voivat parantaa mädin selviytymistä lämpö- tai paineshokeista (Komen & Thorgaard 2007). Taylor ym. (2011) totesivat, että triploidien kalojen tuottamiseksi on välttämätöntä käyttää mätimunia, joiden laatu on paras mahdollinen.

Selviytymiskyvyn vertailututkimuksessa selvitettiin shokkikäsitelyllä sekä tetraploidien ja diploidien risteytyksellä tuotettujen triploidisten kalojen eroja. Risteytetyillä triploideilla oli parempi selviytymiskyky verrattuna shokkikäsitelyihin triploideihin eikä tulos eronnut diploidien selviytymiskyvystä (Chourrout ym. 1986; Myers & Hershberger 1991). Shokkikäsitellyillä diploideilla ja triploideilla karpeilla oli samankaltainen selviytymiskyky aikaisemmissa kehitysvaiheissa, mutta selviytymiskyky oli heikompi verrattuna diploidikontrolleihin (Cherfas ym. 1994). Tämä viittaa siihen, että aiheutettu shokki on päätekijä alkuvaiheen heikommalle selviytymiskyvylle, kun taas triploidia itsessään voi olla syynä heikolle selviytymiselle myöhemmissä vaiheissa. Triploidien ja diploidien poikasten erillisessä kasvatuksessa (omat kasvatusaltaat) kirjolohella (Sheehan ym. 1999), Atlantin lohella (McGeachy ym. 1995; Oppedal ym. 2003), kultaotsa-ahvenella (Haffray ym. 2005) ja meribassilla (Felip ym. 1999) triploidien selviytyminen oli samanlaista tai hieman heikompaa diploideihin verrattuna. Loppukasvatuksen aikana sekaparvissa on havaittu mm. triploidien karppien (Cherfas ym. 1994), kirjolohien (Thorgaard ym. 1982) sekä järvitaimenten (Bonnet ym. 1999) heikompaa selviytymistä diploideihin verrattuna. Toisaalta Atlantin lohella (McGeachy ym. 1995) ei löytynyt ploidia-asteesta johtuvia eroja selviytymisessä. Yleisesti kuitenkin triploidien ja diploidien yhteiskasvatus voi johtaa eroihin selviytymisessä.

Maxime (2008) totesi katsausartikkelissaan, että triploidien ja diploidien kalojen fyysiset vasteet akuuttiin stressiin olivat samanlaiset. Esimerkiksi triploidien ja diploidien kirjolohien hematokriitissä sekä plasman kortisoli- ja glukoosipitoisuuksissa ei ollut eroja kuljetuksen aiheuttaman stressin seurauksena (Leggatt ym. 2006). Wagner ym. (2006) tutkimuksessa selvitettiin kasvatusympäristön (pH, lämpötila) ja kuljetuksen aiheuttamaa stressiä kolmen eri hautomon kirjolohikannoille. Tutkimuksessa ei havaittu merkittäviä eroja kuolleisuudessa diploidien ja triploidien kalojen välillä. Diploidien ja triploidien kalojen vastustuskyky infektioita vastaan on myös todettu tutkimuksissa yleisesti samankaltaiseksi (Ojolick ym. 1995). Tosin triploideilla

kirjolozilla on havaittu lisääntyntä herkkyyttä kidusspesifiselle infektiolle (*Flavobacterium branchiophilum*) verrattuna diploideihin verrokkeihin (Yamamoto and Iida 1994). Cantas ym. (2011) vertasivat diploidien ja triploidien Atlantin lohien ruoansulatuskanavan mikrobistoa ja antibioottiresistenssiä. Bakteerien diversiteetissä ei ollut eroja, mutta triploideilla oli suurempi kokonaismäärä bakteereja suolistossa. Lisäksi osalla triploideista lohista eristetyistä bakteereista oli lisääntynyt vastustuskyky antibiootteja vastaan. Tulos osoittaa triploidialla olevan vaikutuksia myös suolistomikrobeihin ja niiden antibioottiresistenssiin. Thorgaard ym. (1999) puolestaan havaitsivat triploideilla kirjolozilla vähemmän karsinogeneesiä verrattuna diploideihin kaloihin. Tämä on mielenkiintoinen ja lisätutkimuksia vaativa tulos, joka mahdollistaisi triploidien kirjolohien käytön mallina syöpätutkimuksessa.

2.2.4 Käyttäytyminen

Triploidien kalojen käyttäytymisen on toistuvasti havaittu poikkeavan diploidien kalojen käyttäytymisestä (Piferrer ym. 2009). Vaikka triploidien ja diploidien kalojen aggressiivisuudessa ei ole havaittu eroja joissain kokeissa (Wagner 2006), useissa tutkimuksissa on todettu triploidien kalojen olevan vähemmän aggressiivisia verrattuna diploideihin kaloihin. Garner ym. (2008) vertailivat kuningaslohien (*Oncorhynchus tshawytscha*) aggressiivista käyttäytymistä sekä ravintokäyttäytymistä tarkastelemalla diploidi- ja triploidiryhmiä sekä samassa altaassa että erillään. Triploidit kalat olivat ruokinnan aikana vähemmän aggressiivisia verrattuna diploideihin tai sekaryhmiin. Kalojen kortisolitasoissa ei ollut eroja aggressiivisuuskokeiden aikana, mutta kasvukokeen aikana kortisolitasot olivat merkittävästi alhaisemmat triploideilla kaloilla verrattuna diploideihin tai sekaryhmiin. O’Keefe & Benfey (1997) havaitsivat myös heikompaan aggressiivisuutta puronieriöillä, kun triploideja kaloja pidettiin samassa ryhmässä diploidien kanssa. Kyseisessä ryhmässä triploideilla oli alhaisempi asema hierarkiassa diploideihin verrattuna. Tämä ero tosin pieneni kalojen kasvaessa. Triploidien kalojen vähentynyt aggressiivisuus voi vaikuttaa heikentävästi kalojen suorituskykyyn, kasvuun ja selviytymiseen viljelyolosuhteissa (Garner ym. 2008). Alistuvat yksilöt häviävät ravintokilpailussa dominoiville yksilöille ja sosiaalisessa hierarkiassa alistuvilla kaloilla on havaittu toistuvasti kohonneita kortisolipitoisuuksia (Øverli ym. 1999). Viljelyolosuhteilla voidaan kuitenkin vaikuttaa osittain näihin tekijöihin. Esimerkiksi kalojen säännöllinen lajittelu koon mukaan tasaa eroja allaskohtaisesti, jolloin yleisesti altaan yksilöt saavat ravintoa tasaisemmin. Toinen mahdollisuus on kasvattaa triploidit kalat omissa altaissaan tai uomissaan, jolloin kasvu voi olla tasaisempaa verrattuna sekaparviin.

Triploidien kalojen käyttäytymiserot diploideihin verrattuna voivat johtua osin keskushermostollisista syistä (Tiwary ym. 2004). Triploidien kalojen vähempi solumäärä ja hormonitasot (Benfey 1999) voivat vaikuttaa kalojen reagoitukykyyn mm. ravinnosta kilpailtaessa. Steriiliyydestä huolimatta triploideilla kaloilla voi myös ilmentyä kutukäyttäytymistä, jolloin ne voivat mahdollisesti käytöksellään häiritä villien kalojen lisääntymistä. Kutukäyttäytymistä on havaittu mm. triploideilla puronieriäkoirilla (Boulanger 1991).

Triploidien kalojen käyttäytymistä ja selviytymistä luonnossa on tutkittu mm. Atlantin lohilla (Piferrer ym. 2009). Lohien merivaellustutkimuksissa Irlannissa selvisi, että diploidien ja triploidien kalojen välillä oli eroja vaelluksessa takaisin syntymäseudulle (Wilkins ym. 2001). Yleisesti diploidit kalat löysivät paremmin perille triploideihin verrattuna. Triploideista kaloista koiraat palasivat takaisin lähes yhtä hyvin verrattuna diploideihin, kun taas naaraat pääosin eivät löytäneet perille. Suuri osa triploideista kaloista hävisi matkalla ja syitä tähän ei varmuudella tiedetä. Vastaavat tulokset saatiin toisessa kokeessa, jossa triploidien lohien paluu rannikolle ja makeaan veteen oli merkittävästi vähentynyt diploidikontroleihin verrattuna (Cotter ym. 2000). Tutkimustulosten perusteella triploidia voi vähentää mahdollisuutta negatiiviseen vuorovaikutukseen kotoperäisen kalakannan ja triploidisten istukkaiden välillä.

2.3 Triploidian toteaminen

Ploidia-aste voidaan määrittää kaloilla mm. tuman koon mittaamisella, kromosomilaskennalla solupreparaateista ja DNA:n määrää mittaavalla virtaussytometrialla (Piferrer ym. 2009). Halpa ja yleisesti käytetty menetelmä on mitata kalan punasolun pitkän sivun pituus (Benfey & Sutterlin 1984; Benfey 1999), sillä triploidien kalojen tumat ovat suurempia verrattuna diploideihin kaloihin (Ihssen ym. 1990). Kalan tuoreverinäytteestä voidaan valmistaa verisivelynäyte, joka analysoidaan värjäyksen jälkeen. Tämä menetelmä on luotettava, mutta hitaampi verrattuna virtaussytometriaan. Ploidia-aste voidaan myös selvittää laskemalla solun tumajyvistä organisoivat alueet (NOR), karyotyypillä tai mikrosatelliitti DNA markkereiden genotyypillä (Piferrer ym. 2000; Piferrer ym. 2003; Piferrer ym. 2009). Kalojen morfologian silmämääräinen toteaminen on myös yksi ploidia-asteen määrittäytapa. Tässä menetelmässä triploidien kalojen gonadit tarkastetaan teurastuksen ja perkauksen yhteydessä.

Virtaussytometria (FCM) on nopea ja tarkka menetelmä polyploidian toteamiseksi (Thorgaard ym. 1982; Allen 1983; Lecommandeur ym. 1994). Virtaussytometria perustuu fluoresenssiin ja tässä menetelmässä fluoresoivalla aineella, esimerkiksi propidiumjodidilla (PI), värjättyjä soluja säteilytetään (laser) ja solun lähettämän emission voimakkuus kerätään, suodatetaan ja muunnetaan digitaaliseen muotoon tietokoneelle (Ochatt 2006). Solujen analysointi tehdään sekä fluoresenssin että valosironnan perusteella. Virtaussytometrialla voidaan tunnistaa esimerkiksi DNA:n määrä PI-värjätystä kalan punasolusta ja havaitun fluoresenssin määrä on suorassa suhteessa DNA:n määrään. Tulosten tarkastelussa käytetään yleensä graafista esitystapaa (esim. dot plot tai histogrammi). Dot plot on kaksiulotteinen koordinaatisto, jossa x- ja y-akseleille asetetaan sironta- tai fluoresenssikanavien intensiteetit. Jokainen tapahtuma näkyy yksittäisenä pisteenä koordinaatistossa. Histogrammissa x-akselilla on tietyn sironta- tai fluoresenssikanavan intensiteetti ja y-akselilla tapahtumien lukumäärä. Saman intensiteetin solut asettuvat samaan kohtaan muodostaen piikkejä.

Kaloilla näytteenä voidaan käyttää tuore- tai pakastettua verinäytettä, mutta määrittystä on tehty myös kudospäätteistä (Lamatsch ym. 2000; Lecommandeur 1994). Matos ym. (2011) kehittivät virtaussytometria- ja solujen erotteluprotokollan särkikaloiden kudoksille ploidia-asteen ja geenien ilmentymisen määrittämiseksi. Tuloksissa mosaikismia havaittiin kalojen munuais- ja maksakudoksissa, mutta ei veressä. Virtaussytometrian avulla voidaan analysoida 100-150 näytettä päivässä riippuen käytetystä protokollasta. Käytännössä aikaa menee eniten kalojen verinäytteiden keräämiseen, koska varsinainen virtaussytometria-analyysi ja näytteiden valmistus ovat nopeita toteuttaa. Esimerkiksi Devlin ym. (2010) yhdistivät oletettuja triploidinäytteitä (esim. 2 tai 12 näytettä) yhdeksi näytteeksi. Jos virtaussytometriatuloksissa havaittiin diploidisignaali, he valmistivat alkuperäisistä näytteistä uudet näytteet ploidia-asteen varmistamiseksi. Tämä menetelmä vähentää virtaussytometrilla tehtäviä ajokertoja ja siten myös lisää mahdollisuuksia käydä läpi enemmän näytteitä päivässä. Toisaalta yhdistettyjen näytteiden analyyseissä protokollan sekä kontrollien tulee olla luotettavat, jotta tulosten luotettavuus ei kärsi.

Jossain tapauksissa polyploidian tai triploidian aiheuttaminen kaloissa voi johtaa mosaikismiin, jossa ploidia-aste vaihtelee kudosten välillä (Arai 2001). Mosaikismia voi esiintyä mm. tetraploideilla kaloilla ja mosaikismi on ongelmallinen ilmiö triploidian havaitsemisen kannalta. Mosaiikilla kalalla voi olla hedelmöityskykyisiä sukusoluja, vaikka se on verestä saadun näytteen perusteella todettu virtaussytometrialla triploidiksi (Devlin ym. 2010). Mosaiikkien kalojen

tapauksessa on tärkeää varmistaa triploidian onnistuminen ploidian määritysmenetelmillä. Yleinen tapa on tehdä määrittäminen kahdella eri menetelmällä, esimerkiksi verisiveilyillä ja virtaussytometrialla.

2.4 Siikatuotanto vesiviljelyssä

Siika (*Coregonus lavaretus*) on Suomessa luontaisesti esiintyvä kalalaji, joka kuuluu lohikalalojen lahkoon. Siikoihin kuuluvat alamuodot - pohjasiika, karisiika, vaellussiika, tuppisiika, järvisiika ja planktonsiika (Koskela ym. 2002). Lisäksi Suomessa tavataan myös Venäjältä tuotua peledsiikaa (*Coregonus peled*). Siikamuodot erotetaan toisistaan siivilähampaiden lukumäärän ja kutualueiden perusteella.

Vuonna 2010 Suomessa kasvatettiin noin 11,8 miljoonaa kiloa ruokakalaa (Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos 2011). Tästä määrästä kirjolohta oli noin 11 miljoonaa kiloa, siikaa noin 0,7 miljoonaa kiloa ja muita ruokakalalajeja vajaa 0,1 miljoonaa kiloa. Siika on siten toiseksi tärkein viljelty ruokakala Suomessa. Siian perhepohjaista valintajalostusta on toteutettu Suomessa vuodesta 2004 lähtien. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos (RKTL) ja Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus (MTT) kehittävät ja ylläpitävät siian jalostusohjelmaa ja toiminta on keskittynyt Tervon kalanviljelylaitokselle. Siian valintajalostuksen tavoitteena on nostaa elintarvikkeeksi viljeltävän siian laatua parantamalla mm. siian kasvua ja lihanlaatua systemaattisen jalostuksen avulla (Quinton ym. 2007; Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos 2008; Kaase ym. 2011).

Siian kasvatuksen kolme päävaihetta ovat mädintuotanto, alkukasvatus ja jatkokasvatus (Koskela ym. 2002). Lämmitetyllä vedellä siian kasvatus mädistä ruokakalaksi kestää 2-3 vuotta, jolloin siika on myyntikokoisena painoltaan 0,6 kg. Luonnonlämpötiloilla tuotanto kestää yleensä kolme vuotta. Siika tulee sukukypsäksi 3-5-vuotiaana, koiraiden saavuttaessa sukukypsyyden yleensä vuotta aikaisemmin naaraisiin verrattuna. Sukukypsyyttä vaihtelee siikalajin ja muodon mukaan, ja siihen vaikuttavat kalan koko ja kasvunopeus. Siika kutee lokakuun alusta joulukuun puoliväliin saakka ja kutua sekä mädin lopullista kypsymistä säätelevät päivänpituuden lyheneminen ja veden lämpötilan lasku. Luonnossa siikat kutevat, kun vesi on + 2-4 asteista. Ensimmäisen kudun ajankohtaan voidaan vaikuttaa säätelemällä ympäristötekijöitä (mm. valaistusta) ja kasvukauden pituutta kasvatusoloissa.

Veden lämpötilaa nostamalla voidaan nopeuttaa siikojen alkionkehitystä ja kalojen kuoriutumista kasvatusoloissa (Koskela ym. 2002). Cingi ym. (2010) tutkimuksessa havaittiin, että liian suuri

lämpötila (> 7 °C) hedelmöitysvaiheessa lisäsi hedelmöittymättömien ja epänormaalisti jakautuvien mätimunien määrää sekä alkioiden epämuodostumia ja kuolleisuutta. Mitä korkeampi lämpötila oli, sitä suurempia edellä kuvatut muutokset olivat.

Ruokakalatuotannon lisäksi myös mätituotanto on oleellinen osa siikatuotantoa. Siian mäti on otettava talteen ennen kutua, koska siiat voivat kutea mädin altaaseen. Mätituotanto lisää kuitenkin tuotantokustannuksia johtuen pidemmästä tuotantokierrosta ja mädin talteenotosta. Mätiiä saadaan ensimmäisen kerran, kun siiat ovat 3-5-vuotiaita ja 0,5-1,3 kg painoisia.

Bioteknologiset sovellukset ovat nykyisin vähäisiä siianviljelyssä. Toisin kuin kirjolohella, täysnaarastekniikka ei toimi kunnolla siialle ja triploidisaatiotekniikat ovat vielä kehittymässä. Siian triploidisaatiolla pyritään samoihin asioihin kuin muillakin triploidisten kalalajien tuottamisella. Tärkeimpinä tekijöinä ovat siian kasvun parantaminen, hyvälaatuisen lihan saaminen ympäri kasvukauden sekä istutusmahdollisuudet virkistyskalastuksen tarpeisiin. Triploidisaation huonona puolena siian kohdalla on mätituotannon menettäminen. Lisäksi toistaiseksi 100 % triploidituotantomenetelmää ei ole vielä kehitetty. Sopivien tuotantomenetelmien ja asetusten löytäminen ovat tärkeitä tekijöitä myös triploidisten siikojen tuotannossa. Oikeilla menetelmillä voidaan parantaa poikassaantoa sekä lisätä triploidisten kalojen osuutta. Lisäksi yhtenä haasteena tulevaisuudessa on triploidisen siian markkinointi kuluttajille.

2.5 Triploidisaation tulevaisuuden mahdollisuudet ja haasteet vesiviljelyssä

Triploidien kalojen käyttöä istutuskaloina urheilu- tai virkistyskalastuksen tarpeisiin on tutkittu verrattain vähän. Kozfkay ym. (2006) tutkimuksessa triploideja kirjolohia istutettiin pyyntikokoisena jokiin sekä ylänkøjärviin Idahossa. Triploidit kalat menestyivät hyvin jokiolosuhteissa, mutta huonosti ylänkøjärvissä, joissa triploidien kasvu oli hitaampaa ja kuolleisuus suurempaa verrattuna diploideihin. Tämä voi selittyä karuilla olosuhteilla (ravinnonpuute, kylmä ilmasto, alhaiset happipitoisuudet talviaikana). Teoriassa triploidit kalat tarjoaisivat istukkaina hyvän mahdollisuuden rikastaa vesistöjä, koska steriiliyydestä johtuen triploidit eivät pysty lisääntymään luonnonkantojen kanssa. Tämä estäisi istukkaiden ja luonnonkantojen geneettisen sekoittumisen ja näin suojelisi alkuperäislajien geeniperimää. Lisäksi steriilit istukkaat tarjoaisivat hyvän lisän virkistyskalastusalueille, joissa luontainen kanta ei riitä vastaamaan kalastustarpeita (High & Meyer 2009).

Jotta triploideja kaloja voitaisiin systemaattisesti istuttaa luontoon, kalalajin tulisi olla vesistöön sopiva ja triploidia-asteen tulisi olla varmuudella 100 %, jotta geneettistä sekoittumista ei tapahtuisi (Kozfkay ym. 2006). Iso-Britanniassa vuonna 2015 astuu voimaan säännös, jonka mukaan kaikkien luontoon istutettavien laitostenttien olevien järvitaimentien on oltava steriilejä täysnaarastriploideja (Environment Agency 2009). Toiseksi mahdollisen triploidin istukaslajin käyttäytyminen tulisi tietää etukäteen, jotta välttyttäisiin tilanteelta, jossa triploidit syrjäyttävät tai valtaavat elintilaa alkuperäislajilta. Tätä on käytännössä mahdotonta testata etukäteen suuressa mittakaavassa. Esimerkiksi triploidit istukas voi jäädä istutuspaikan läheisyyteen kilpailemaan ravinnosta vaeltavien villien lohen- tai taimentien poikasten kanssa, kantaa tauteja tai houkuttaa normaalia suurempia määriä predaattoreita paikalle (Wilkins ym. 2001). Näillä kaikilla tekijöillä on vaikutusta luonnonkalakantoihin. Toisaalta 100 % steriilien istukkaiden käyttöä voitaisiin harkita tilanteessa, jossa viljelty kalalaji on päässyt karkaamisen seurauksena leviämään ja lisääntymään ja on esimerkiksi vallannut elintilaa vesistön luontaisilta kalalajeilta (Piferrer ym. 2009). Tällöin saman lajin triploideja koiraita istuttamalla voitaisiin mahdollisesti häiritä karkureiden lisääntymistä, koska triploidit koiraat mahdollisesti säilyttävät lisääntymiseen liittyvän kutukäyttäytymisen (mm. naaraista kilpaileminen, muiden koiraiden karkoittaminen).

Tulevaisuuden näkymiin liittyy ensisijaisesti triploidisaatiotekniikoiden kehittäminen ja optimointi kalalajeille, joita se puuttuu. Kalanviljelyn lisäksi triploideilla kaloilla voi olla käyttöä myös tutkimuksessa. Lisääntymisfysiologiassa triploidit kalat voivat tarjota uutta tietoa steriiliyttä ja sukukypsyyden puuttumisesta aiheuttavista mekanismeista, jotka voivat olla samankaltaisia kuin muilla selkärangkaisilla ihmiset mukaan luettuina (Felip ym. 2009). Triploideilla kirjolohilla on havaittu vähemmän karsinogeneesiä verrattuna diploideihin kaloihin (Thorgaard ym. 1999). Näin ollen sovellusmahdollisuuksia voisi olla myös syöpätutkimuksessa. Kalalajien säilyminen ja kestävä kehitys on yksi tulevaisuuden haasteista. Yksi mahdollisuus liittyy triploidien sijaisemokalakantojen perustamiseen. Tässä menetelmässä uhanalaisen kohdekalalajin alkiokantasoluja siirretään vastaanottajana toimivaan sukulaiskalalajiin, joka sukukypsyyden saavuttaessaan tuottaa kohdelajin mätää tai maitia (Okutsu ym. 2007). Tämä on mielenkiintoinen vaihtoehto uhanalaisten kalalajien turvaamiseksi.

3. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tutkimuksen päätavoitteena oli kehittää menetelmä triploidisten siikojen tuottamiseksi hydrostaattisen paineshokkikäsitteilyn avulla. Tutkimuksessa käytettiin neljää asteminuuttiryhmää (100, 200, 300, 400 °Cmin) ja verrattiin kahta eri paineshokkia (9000 ja 10 000 psi). Triploidian määrittäminen tehtiin virtaussytometrialla siikojen pakastetusta verinäytteestä. Triploidian lisäksi kaloista mitattiin verinäytteenottohetkellä pituudet, painot, elävyydet ja mahdolliset epämuodostumat. Tutkielman tavoitteena oli löytää mahdollisimman hyvän triploidiasaannon sekä elävyyden tuottava käsittely.

Tutkielmassa pyrittiin saamaan vastaukset seuraaviin kysymyksiin:

1. Mikä asteminuuttiryhmä tuottaa eniten triploideja siikoja ja antaa parhaimman elävyyden?
2. Kumpi painemäärästä (9000 ja 10 000 psi) tuottaa enemmän triploideja siikoja?

Pro gradu -tutkielmaa varten tehtiin kaksi esitettä olosuhteiden haarukointiin. Ensimmäisessä esitessä vuonna 2010 määritettiin polyploidiataso hieman alle 1-vuotiaiden siikojen pakastetuista terminaaliverinäytteistä virtaussytometriaprotokollan optimoimiseksi. Toisessa esitessä vuonna 2011 kokeiltiin terminaaliverinäytteenottoa pienemmillä kaloilla verinäytteenoton optimoimiseksi, koska ensimmäisen esitteen siikat olivat selvästi suurempia verrattuna pro gradun aineistona oleviin siikoihin niiden näytteenottohetkellä. Toinen esite toteutettiin triploideilla harmaanieriöillä.

Virtaussytometriaprotokollaa pakastetulle verinäytteelle on aiemmin optimoitu myös Biotieteiden projektityössä (Nousiainen & Granlund 2011) vuosina 2009-2011. Tätä protokollaa testattiin kirjolohien ja siikojen verinäytteillä ennen varsinaisia pro gradun aineiston virtaussytometria-analyyssejä. Virtaussytometriaprotokollaa polyploidiatason määrittämiseksi testattiin myös triploidisten kirjolohien mätimunilla. Tämän testin seurauksena kehitettiin protokollat mätimuna-analyyssejä varten kolmelle eri kehitysasteelle (50-100, 170-340, 340-) päiväastetta (d°C) (Liite 2 C-E). Päiväasteet saadaan, kun lasketaan yhteen hedelmöityspäivästä lähtien päivittäiset veden keskilämpötilat.

4. AINEISTO JA MENETELMÄT

Ensimmäisen esitestin siiat tuotettiin Tervon RKTL:n laitoksella marraskuussa vuonna 2009. Kaloille tehtiin paineshokkikäsittely (10 000 psi, 5 min, + 5 °C vesi) ja asteminuuttiryhmiksi valittiin 175, 200 ja 225 °Cmin. Kalat kasvoivat laitosolosuhteissa vajaan vuoden ja verinäytteenotot sekä virtausytometria-analyysit tehtiin syys-lokakuun 2010 aikana. Kalat lopetettiin nukutusaineen (MS-222) yliannostuksella, minkä jälkeen terminaaliverinäytteet kerättiin (Liite 2 A). Virtausytometria-analyysit tehtiin A.I. Virtanen Instituutissa ja jokaisesta käsittelyryhmästä analysoitiin 30 pakastettua verinäytettä.

Toisen esitestin triploidiset harmaanieriät tuotettiin paineshokilla Tervon RKTL:n laitoksella syksyllä vuonna 2010. Kaloille tehtiin paineshokkikäsittely (9500 psi, 5 min, + 10 °C vesi) ja asteminuuttiryhmiksi valittiin 200, 300 ja 400 °Cmin. Verinäytteenottohetkellä helmikuussa 2011 kalat olivat melkein kuluttaneet ruskuaispussinsa loppuun. Poikaset lopetettiin nukutusaineen (MS-222) yliannostuksella, minkä jälkeen terminaaliverinäytteet kerättiin (Liite 2 A).

4.1 Kalat ja käsittelyryhmät

Tutkielmassa käytettiin Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen (RKTL) Tervon toimipaikassa viljeltävän Kokemäenjoen vaellussiian mätiä ja maitia. Valintajalostusohjelmasta peräisin olevat siikanaaraat olivat lypsettäessä 6-vuotiaita ja koiraat 5-vuotiaita. Mäti lypsettiin isosta määrästä naaraita yhteiseen astiaan 8.11.2010. Mätiä käytettiin kokeeseen yhteensä 2,5 litraa. Maiti lypsettiin kuudestatoista koiraasta 9.11.2010 yhteiseen astiaan. Sekä mäti että maiti säilöttiin kylmässä hedelmöityksiin ja painekäsittelyihin saakka.

Kokeen käsittelyryhmät muodostettiin valitsemalla paineshokin aloitusajankohdaksi neljä aikapistettä, jotka ilmoitettiin asteminuutteina (°Cmin). Nämä aikapisteet olivat 100, 200, 300 ja 400 °Cmin, joista jokaisesta tehtiin kolme rinnakkaista ryhmää (A, B ja C). Painemääräksi valittiin 9000 ja 10 000 psi. Kokeeseen tuli käsittelyryhmiä yhteensä 24 kappaletta, käsittelemättömiä kontrolliryhmiä oli yksi. Yhteenveto koejärjestelyistä on esitetty Taulukossa 1.

Taulukko 1. Mädin hedelmöitys- ja paineshokkikäsitelyjärjestys sekä aikataulut. Siian mädille tehtiin hydrostaattinen paineshokkikäsitely (Liite 1) 20 min (100 °Cmin), 40 min (200 °Cmin), 60 min (300 °Cmin) ja 80 min (400 °Cmin) kohdalla hedelmöityksen jälkeen. Paineshokkikäsitelyjen kesto oli 5 min ja veden lämpötila + 5 °C ($\pm 0,1$ °C).

Hedelmöityksen aloitus (klo)	Käsittelyryhmät (C°min)			
	A	B	C	
10:00	400 A	-	-	
10:20	300 A	400 B	-	
10:40	200 A	300 B	400 C	Kontrolli
11:00	100 A	200 B	300 C	
11:20	10 000 psi	100 B	200 C	
11:40		10 000 psi	100 C	
12:00			10 000 psi	
13:00	400 A			
13:20	300 A	400 B		
13:40	200 A	300 B	400 C	
14:00	100 A	200 B	300 C	
14:20	9000 psi	100 B	200 C	
14:40	-	9000 psi	100 C	
15:00	-	-	9000 psi	

4.2 Mädin hedelmöitys ja paineshokkikäsitely

Mädit jaettiin 0,5 l muovirasioihin käsittelyryhmäkohtaisesti siten, että jokaisessa ryhmässä oli 1,0 dl mätiä (noin 4500 mätimunaa). Mädit hedelmöitettiin kuivamenetelmällä ja jokaiseen ryhmään lisättiin ruiskulla 0,3 ml koiraiden maitiseosta ja sekoittamisen jälkeen lisättiin hedelmöitysluos (Billard ym. 1986); 154 mM NaCl (Tamro), 20 mM Tris (MP Biomedicals), 30 mM glysiini (MP Biomedicals), ja inkuboitiin 60 sekuntia. Hedelmöityksen jälkeen mätiä huuhdeltiin kolme kertaa +5 °C vedellä. Mädin hedelmöitys tapahtui sarjoittain 20 minuutin välein (Taulukko 1). Kontrolliryhmä hedelmöitettiin yllä kuvatulla tavalla, mutta sille ei tehty paineshokkikäsitelyä.

Hedelmöitettyt käsittelyryhmät laitettiin omiin merkattuihin vedessä oleviin harsopusseihin. Tämän jälkeen pussit siirrettiin vettä täynnä olevaan painekammioon paineshokkikäsitelyä varten (Liite 1). Painekammioon meni kerralla neljä harsopussia sarjoittain, esim. 400 A, 300 A, 200 A ja 100 A. Veden lämpötila oli kaikkien käsittelyjen aikana + 5 °C. Aamupäivän kolme paineshokkikäsitelyä tehtiin 10 000 psi:n paineella ja iltapäivällä käytettiin 9 000 psi:n painetta. Paineshokkien kesto oli molemmilla paineilla 5 minuuttia. Yhteensä paineshokkikäsitelyjä tehtiin päivän aikana kuusi kappaletta (Taulukko 1).

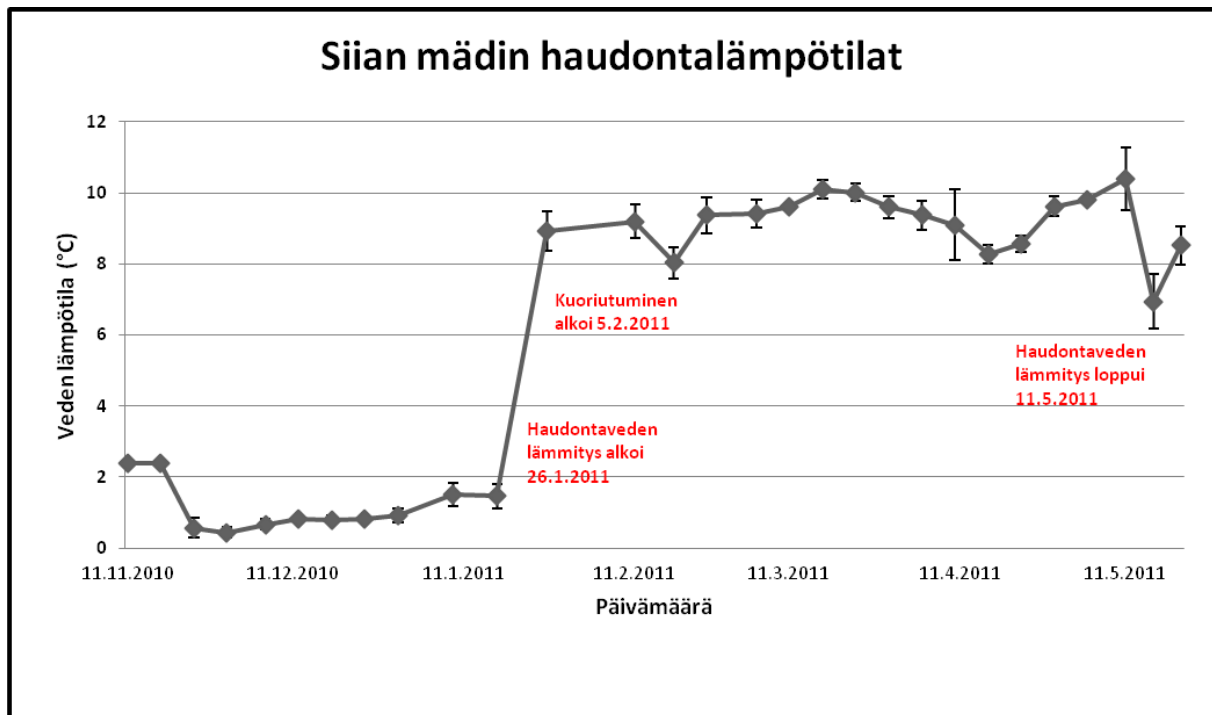
4.3 Mädin haudonta, poikasten kuoriutumisen ja kasvu

Painekäsittelyn jälkeen mätimunat siirrettiin ryhmäkohtaisesti omiin merkattuihin muovirasioihin. Muovirasioihin laitettiin kannet tiiviisti paikalleen ja rasiat siirrettiin sarjoittain hautomosta poikashalliin akklimoitumaan ennen haudontasuppiloihin sijoittamista. Akklimaatio tehtiin kelluttamalla rasioita pyöröaltaassa, jonka veden lämpötila oli + 2,4 °C. Pisin akklimoituminen oli klo 11:20 painekäsittelystä sarjalla A, yhteensä noin viisi tuntia. Lyhin akklimoituminen oli klo 15:00 painekäsittelystä sarjalla C, yhteensä noin puoli tuntia. Akklimoinnin jälkeen ryhmät siirrettiin satunnaisessa järjestyksessä haudontasuppiloihin (Kuva 2). Sijoittelun jälkeen jokaisen ryhmän allaspaikat merkattiin ja mädin huoltotoimenpiteet aloitettiin.



Kuva 2. Siian mädin haudontasuppiloita. Kuva: A. Nousiainen 2010, RKTL Tervo.

Mädin haudontaa seurattiin päivittäin aina kuoriutumiseen (yli 100 päiväastetta) asti. Päivittäisiin huoltotoimenpiteisiin kuuluivat haudontasuppiloiden vesityksen tarkastus aamulla ja iltopäivällä. Joka toinen päivä kuolleet mätijyvät imettiin pois lappoletkulla ja joka toinen päivä suppilot puhdistettiin linnunsulalla varovasti mädin liikkeen ylläpitämiseksi. Veden lämpötila kirjattiin päivittäin (Kuva 3). Alussa mädin haudonta tehtiin luonnonvedellä. Lämmitettyä vettä alettiin käyttää 26.1.2011 kehityksen nopeuttamiseksi. Siianpoikasten kuoriutuminen alkoi 5.2.2011. Poikasten starttiruokinta aloitettiin 11.2.2011 ja rehuna käytettiin Gemma Micro 150 –rehua (Skretting). Lämmitystä pidettiin 11.5.2011 asti, jonka jälkeen haudonta jatkui luonnonvedellä. Poikasia kasvatettiin toukokuuhun 2011 asti, jonka jälkeen aloitettiin verinäytteiden otot.



Kuva 3. Siikojen mädin haudontalämpötilat. Mädinhaudonta alkoi 11.11.2010 ja alussa lämpötila määräytyi luonnonveden mukaisesti. Haudontaveden lämmitys kehityksen nopeuttamiseksi aloitettiin 26.1.2011. Poikasten kuoriutumisen alkoi 5.2.2011. Haudontaveden lämmitys lopetettiin 11.5.2011.

4.4 Verinäytteenotot

Aineiston kerääminen tehtiin 11.5. – 13.5.2011 ja 17.5.2011 (Liite 2 A). Poikaset olivat tällöin kasvaneet kolme kuukautta ja olivat noin 5 cm pituisia. Ryhmien valintajärjestys verinäytteenottoon satunnaistettiin. Jokaisesta käsittelyryhmästä otettiin sattumanvarainen määrä siikoja, jotka siirrettiin näytteenotto paikalle. Tästä määrästä otettiin yksi kala kerrallaan käsittelyyn ja tavoitemäärän (32 kpl / käsittelyryhmä) täytyttyä loput kalat palautettiin altaaseen. Kaikista ryhmistä ei saatu tavoitemäärää johtuen kuolleisuudesta mädin haudonnan sekä poikasten kasvatuksen aikana. Näiden ryhmien kohdalla altaasta otettiin näytteenottoon kaikki kalat. Kalat nukutettiin, minkä jälkeen jokaisesta kalasta mitattiin pituus, paino sekä tutkittiin mahdolliset epämuodostumat, joiksi luokiteltiin selkärangan skolioosi ja lordoosi sekä leuan epämuodostumat. Terminaaliverinäytteenotossa nukutetun kalan pyrstö katkaistiin pyrstönkaulasta saksilla ja verinäyte valutettiin 96-kuoppalevyn näytekohtaiseen kuoppaan, joka sisälsi valmiiksi 160 µl kylmää 70 % etanolia ilman hepariinia. Pырstön katkaisukohta upotettiin etanolipinnan alle ja verinäytteen keräyksen jälkeen näyte sekoitettiin varovaisesti pipetillä muutaman kerran.

Näytteenoton aikana 96-kuoppalevyä pidettiin jäällä ja lopuksi kuoppalevyt suljettiin ja pakastettiin (-20 °C).

Näytteenoton yhteydessä kirjattiin myös altaiden biomassa, toisin sanoen laskettiin elossa olevien kalojen lukumäärä ja määritettiin niiden yhteispaino. Tätä tietoa käytettiin myöhemmin allas / ryhmäkohtaisen elävyyden laskemiseksi. Lähtötilanteessa jokaisessa altaassa oli 1,0 dl mätää (noin 4500 alkiota). Elävyysprosentti laskettiin jakamalla verinäytteenottohetkellä elossa olevat kalat / ryhmä lähtökohtaisella alkiomäärällä (4500 alkiota) * 100.

4.5 Virtaussytometria

Virtaussytometria-analyysit tehtiin A.I. Virtanen Instituutissa Becton Dickinson FACSCalibur – virtaussytometrillä (Becton Dickinson CellQuest Pro –ohjelmisto). Analyyseihin sovellettiin Biotieteiden projektityössä (Nousiainen & Granlund 2010) kehitettyä ja optimoitua protokollaa pakastetulle verinäytteelle (Liite 2B). Pakastetut verinäytteet (-20 °C) sekoitettiin ja näytteestä otettiin osa jatkokäsittelyyn. Loput säilöttiin (-20 °C) myöhempää käyttöä varten. Sentrifugoinnin jälkeen näytettä pestiin ja välissä sekoitettiin hyvin. Näytteet värjättiin propidiumjodidilla ja niitä inkuboitiin 15-20 min pimeässä. Näytteestä otettua supernatanttia laimennettiin kylmällä 1 x PBS:llä. Virtaussytometria-ajossa näytteistä mitattiin 10 000 solun tumien pinta-alat / näyte.

Virtaussytometria-analyysit toteutettiin kahdella ajokerralla. Tilastolliseen käsittelyyn hyväksyttiin molemmista ajokerroista näytteet, jotka ylittivät analyyseissä 5000 tapahtuman rajan, kun maksimimittausmääränä oli 10 000 tapahtumaa / näyte (Taulukko 2). Ensimmäisellä ajokerralla analysoitiin yhteensä 250 näytettä, eli jokaisesta ryhmästä 10 näytettä. Ensimmäinen ajokerta toteutettiin aikavälillä kesä – lokakuu 2011 noin kymmenen analyysipäivän aikana. Toisella ajokerralla samat näytteet analysoitiin uudelleen tulosten luotettavuuden lisäämiseksi ja yhteensä analysoitiin 213 näytettä. Toinen ajokerta toteutettiin aikavälillä lokakuu 2011 – tammikuu 2012 noin kymmenen analyysipäivän aikana. Siian verinäytteitä varastoitiin virtaussytometria-analyysien välisenä aikana pakastimessa (-20 °C). Jokainen näyte luokiteltiin yhden analyysiajon perusteella joko diploidiksi tai triploidiksi näytteeksi. Luokittelu tehtiin silmämääräisesti vertaamalla näytteen muodostamaa kuvaajaa kontrollinäytteeseen histogrammissa, jossa saman intensiteetin solut asettuivat samaan kohtaan muodostaen piikkejä. Kontrollit ja diploidinäytteet muodostivat piikit kuvaajaan eri kohtiin verrattuna triploideihin näytteisiin.

Taulukko 2. Paineshokkikäsiteltyjen triploidisten siikojen verinäytteet asteminuuttiryhmissä 100-400 °Cmin virtausytometria-analyyseissä (Becton Dickinson FACSCalibur) ensimmäisellä (n=250) ja toisella (n=213) ajokerralla. Paineshokin kesto oli 5 min molemmilla painemäärillä.

Käsittely	Virtausytometria		
		1. ajokerta	2. ajokerta
Aste- minuutit (C°min)	Paine- määrä (psi)	Näyte- määrä (kpl)	Näyte- määrä (kpl)
100 A-C	9000	30	19
Kontrolli	-	3	3
100 A-C	10 000	30	29
Kontrolli	-	3	3
200 A-C	9000	30	25
Kontrolli	-	3	3
200 A-C	10 000	30	29
Kontrolli	-	3	3
300 A-C	9000	21	21
Kontrolli	-	3	3
300 A-C	10 000	30	21
Kontrolli	-	3	3
400 A-C	9000	30	23
Kontrolli	-	3	3
400 A-C	10 000	25	22
Kontrolli	-	3	3
Yhteensä		250	213

Aluksi ensimmäisellä ajokerralla käytettiin näytteenvalmistusprotokollaa, jossa näytteen lähtötilavuus oli 100 µl ja 1 x PBS-pesuja oli vain yksi. Sen jälkeen näytteen lähtötilavuutta pienennettiin 50 µl:aan alkuperäisen pakasteverinäytteen säästämiseksi. Jokaisella analyysikerralla käytettiin yhtä diploidisiikakontrollia vertailunäytteenä.

4.6 Tilastollinen käsittely

Rinnakkaisille ryhmille (A-C) laskettiin keskiarvot keskihajontoineen pituuksista, painoista ja epämuodostumien esiintyvyyksistä tavoitemäärän (32 kalaa / ryhmä) perusteella. Niiden ryhmien kohdalla joilla tavoitemäärä ei täyttynyt, laskut tehtiin kaikista eloonjääneistä kaloista / ryhmä.

Rinnakkaisille ryhmille laskettiin elävyyssprosenttien keskiarvot keskihajontoineen verinäytteenottohetkellä kaikista elossa olevista kaloista / ryhmä (elossa olevat kalat / ryhmä jaettuna lähtökohtaisella alkiomäärällä (4500 alkiota) * 100).

Virtaussytometria-analyyseissä jokainen näyte luokiteltiin yhden analyysiajon perusteella joko diploidiksi tai triploidiksi näytteeksi. Luokittelu tehtiin silmämääräisesti vertaamalla näytteen muodostamaa kuvaajaa kontrollinäytteeseen. Triploidia-asteet määritettiin kullekin rinnakkaiselle ryhmälle erikseen ja ryhmille laskettiin keskiarvot ja keskihajonnat. Rinnakkaisten ryhmien tilastolliset vertailut triploidia-asteissa tehtiin erikseen ensimmäiselle ja toiselle ajokerralle.

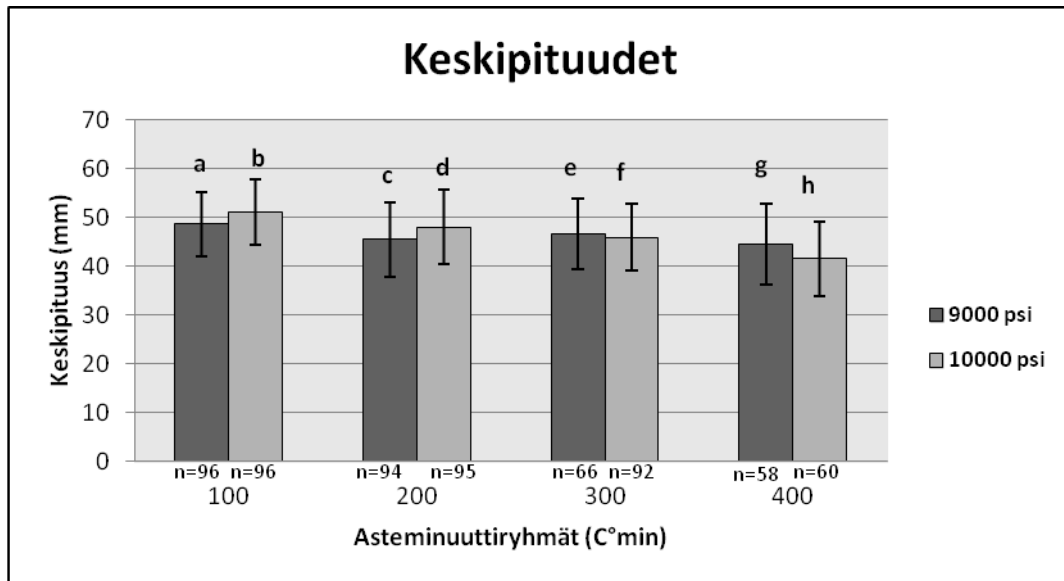
Pro gradu tutkielman aineisto käsiteltiin IBM Statistics SPSS 19 –ohjelmistolla. Rinnakkaisten (A-C) asteminuuttiryhmien (100-400 °Cmin) ja paineryhmien (9000 ja 10 000 psi) väliset erot pituuksissa, painoissa, elävyyksissä, epämuodostumissa sekä triploidia-asteissa analysoitiin Kruskal-Wallis testillä ja parittaisella vertailulla, koska muuttujien normaalijakaumaoletus ($p > 0,05$) ei täyttnyt Kolmogorov-Smirnovin testillä (kaikilla muuttujilla $p < 0,05$). Kruskal-Wallis testiä varten asteminuuttiryhmien sopivuus (ei vinoumia aineistossa) testattiin. Ryhmien väliset erot katsottiin tilastollisesti merkitseviksi, kun p :n arvo oli alle 0,01 ja melkein merkitseviksi, kun p :n arvo oli alle 0,05. Muuttujamuunnoksia ei tehty. Epämuodostumien tilastolliseen analyysiin otettiin mukaan ainoastaan ryhmät, joissa epämuodostumia esiintyi. Tulosten luotettavuuden lisäämiseksi triploidia-asteiden tilastollisissa analyyseissä huomioitiin ainoastaan näytteet, jotka saivat virtaussytometria-analyysissä yli 5000 tapahtumaa (maksimi 10 000).

5. TULOKSET

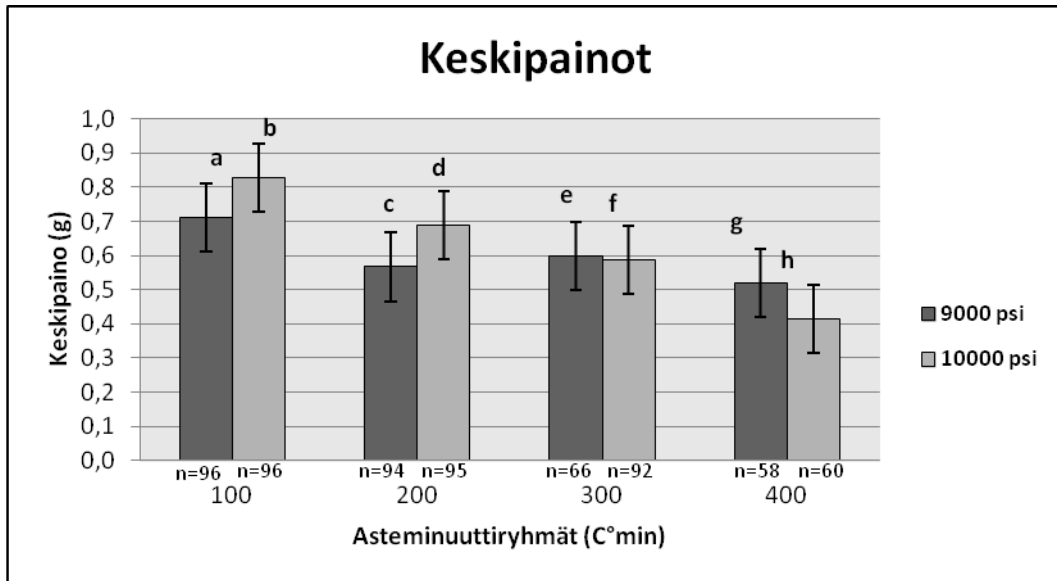
Ensimmäisen esitestin (10 000 psi, 5 min, + 5 °C vesi) parhaimmassa käsittelyryhmässä (200 °Cmin) triploidia-aste oli 33 %. Toiseksi parhaimmassa ryhmässä (175 °Cmin) triploidia-aste oli 30 % ja heikoimmassa ryhmässä (225 °Cmin) 17 %. Koska esitestissä triploidisten siikojen saantoprosentti jäi alhaiseksi, pro gradussa käytettiin laajempaa vaihteluväliä asteminuuttiryhmissä sekä kahta eri painetta paremman triploidisaannon saavuttamiseksi.

5.1 Keskipituus ja keskipaino, elävyys ja epämuodostumat

Tulokset rinnakkaisten käsittelyryhmien (100-400 °Cmin, 9000/10 000 psi) keskipituuksista ja keskipainoista sekä ryhmienvälisistä tilastollisista merkitsevyyksistä on koottu Kuviin 4 ja 5. Keskipituus ja -paino oli suurin ryhmässä 100 °Cmin paineella 10 000 psi ($51,1 \pm 6,6$ mm ja $0,83 \pm 0,31$ g) ja pienin ryhmässä 400 °Cmin paineella 10 000 psi ($41,5 \pm 7,7$ mm ja $0,41 \pm 0,24$ g). Ero näiden ryhmien välillä oli tilastollisesti merkitsevä ($p < 0,01$).



Kuva 4. Paineshokkikäsiteltyjen triploidisten siikojen keskipituudet \pm keskihajonnat rinnakkaisissa (A-C) ryhmissä (100-400 °Cmin) kahdessa eri painemäärässä (■=9000 psi ja □=10 000 psi). Ryhmien kalamäärät on ilmoitettu kuvassa pylväiden alla. Ryhmienväliset tilastolliset merkitsevyydet on ilmoitettu kirjainkoodeilla molemmille painemäärille. $p < 0,01$: a-b; a-f; b-d; b-e; b-g; d-g; e-g), $p < 0,05$: a-c; c-d).

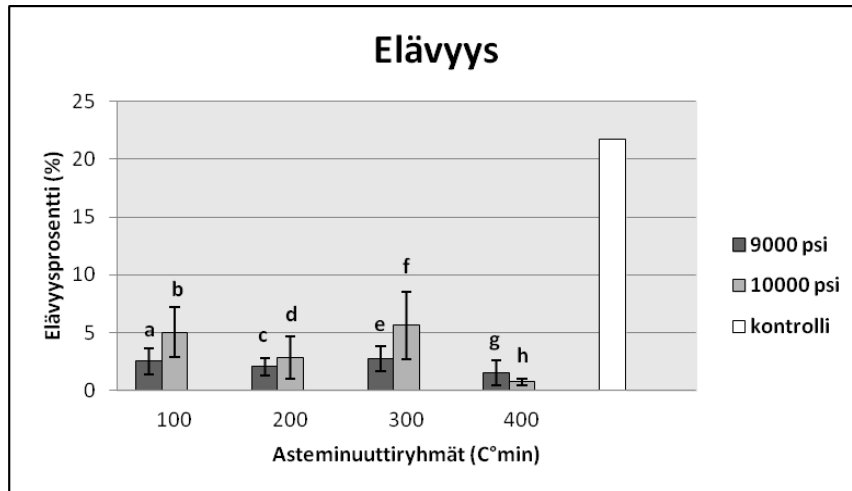


Kuva 5. Paineshokkikäsiteltyjen triploidisten siikojen keskipainot \pm keskihajonnat rinnakkaisissa (A-C) ryhmissä (100-400 °Cmin) kahdessa eri painemäärässä (■=9000 psi ja □=10 000 psi). Ryhmien kalamäärät on ilmoitettu kuvassa pylväiden alla. Ryhmienväliset tilastolliset merkitsevyydet on ilmoitettu kirjainkoodeilla molemmille painemäärille. $p < 0,01$: a-b; a-c; a-g; b-d; b-f; b-h; d-h; f-h). $p < 0,05$: c-d; g-h.

Kontrolliryhmän keskipituus ja -paino ($40,6 \pm 5,1$ mm ja $0,43 \pm 0,17$ g) oli pienin verrattuna kaikkiin käsittelyryhmiin. Tämä johtui siitä, että kontrolliryhmässä oli eniten kaloja elossa (elävyys 22 %). Tämän seurauksena kontrolliryhmän kalojen pituudet ja -painot jäivät pienemmiksi verrattuna käsittelyryhmiin, joissa pienemmät allaskohtaiset kalatiheydet mahdollistivat paremman kasvun kontrolliryhmään verrattuna.

Elävyysprosentit olivat yleisesti alhaiset kaikissa ryhmissä (Kuva 6). Eniten kaloja oli elossa kontrolliryhmässä (22 %). Käsittelyryhmien korkein elävyys oli ryhmässä 300 °Cmin paineella 10 000 psi ($5,6 \pm 2,9$ %) ja alhaisin ryhmässä 400 °Cmin paineella 10 000 psi ($0,7 \pm 0,3$ %). Yleisesti kaikkien ryhmien välillä oli merkitsevät erot elävyyksissä ($p < 0,01$). Alhaisen elävyyden syynä oli todennäköisesti tavanomaista heikkolaatuisempi siianmäti.

Epämuodostumista havaittiin ainoastaan selkärangan skolioosia, jota oli eniten ryhmässä 300 °Cmin paineella 10 000 psi ($5,4 \pm 4,8$ %) (Taulukko 3). Ero kontrolliryhmään (3,1 %) oli merkitsevä ($p < 0,01$).



Kuva 6. Paineshokkikäsiteltyjen triploidisten siikojen elävyysprosentit \pm keskihajonnat rinnakkaisissa (A-C) ryhmissä (100-400 °Cmin) kahdessa eri painemäärässä (■=9000 psi ja □=10 000 psi). Ryhmienväliset tilastolliset merkitsevyydet on ilmoitettu kirjainkoodeilla molemmille painemäärille $p < 0,01$: a-b; a-c; a-g; b-d; b-h; c-e; c-g; d-f; d-h; e-f; e-g; f-h.

Taulukko 3. Paineshokkikäsiteltyjen triploidisten siikojen epämuodostumien prosentit \pm keskihajonnat rinnakkaisissa (A-C) ryhmissä (100-400 °Cmin) kahdessa eri painemäärässä (9000 ja 10 000 psi). Taulukon näytemäärä on rinnakkaisten ryhmien yhteiskalamäärä, joita käytettiin keskipituuksien ja -painojen sekä epämuodostumien laskemisessa. Ryhmienväliset tilastolliset merkitsevyydet on ilmoitettu kirjainkoodeilla molemmille painemäärille $p < 0,01$: a-f; a-i; c-i; d-i; $p < 0,05$: c-f; d-f;

Käsittely-ryhmä (° min)	Paineshokki (psi)	Näytemäärä (kpl)	Epämuodostumat (%)	
100 A-C	9000	96	1 \pm 1,8	a
100 A-C	10000	96	-	b
200 A-C	9000	94	1 \pm 1,9	c
200 A-C	10000	95	1,1 \pm 1,8	d
300 A-C	9000	66	-	e
300 A-C	10000	92	5,4 \pm 4,8	f
400 A-C	9000	58	-	g
400 A-C	10000	60	-	h
Kontrolli	-	32	3,1	i
Yhteensä		689		

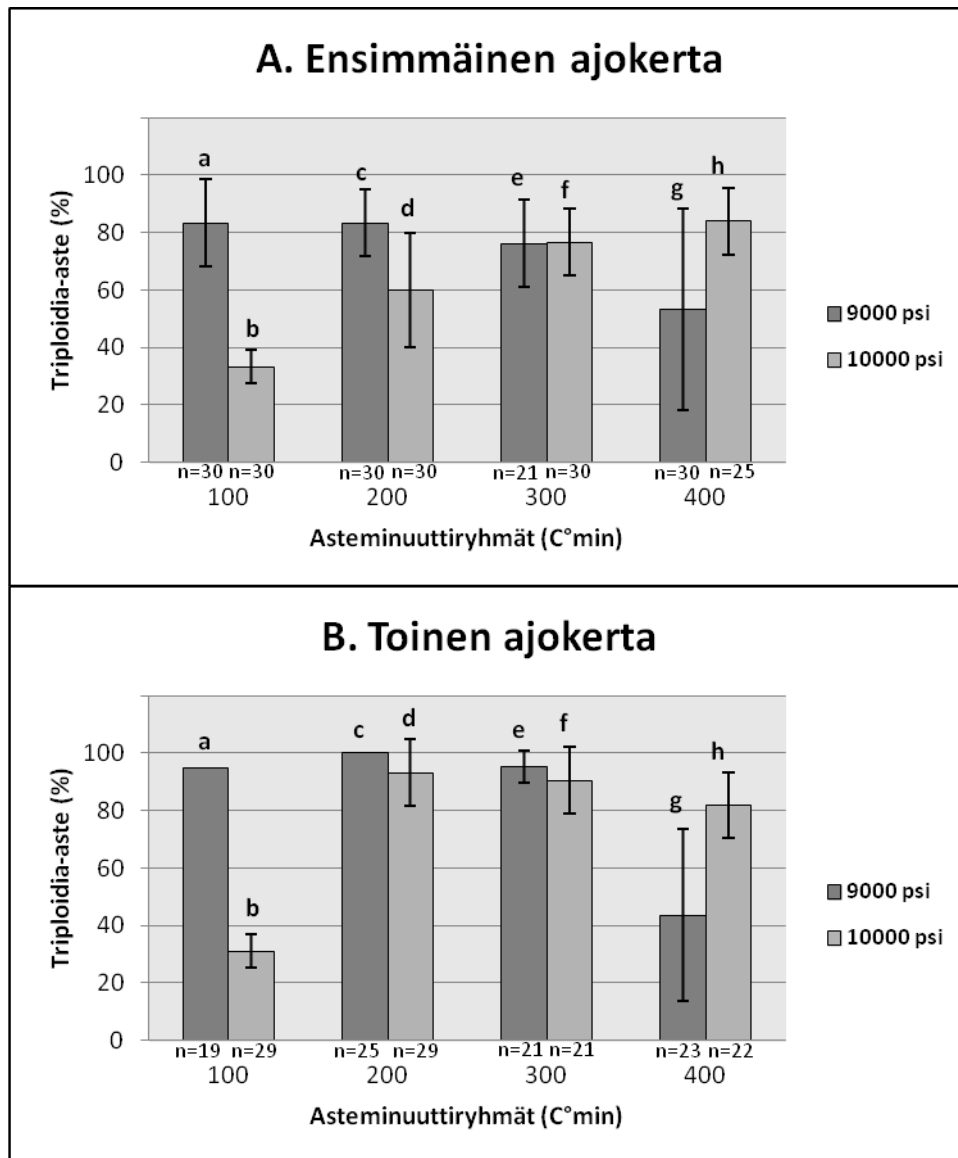
Kasvun kannalta parhaimmat tulokset saatiin ryhmillä 100-300 °Cmin. Asteminuuttimäärien kasvaessa molemmilla painemäärillä ryhmien välillä havaittiin pienenemistä sekä keskipituuksissa että keskipainoissa. Tämä nähtiin selvemmin keskipainoissa. Korkein elävyys oli kontrolliryhmässä (22 %). Käsittelyryhmistä korkein elävyys oli ryhmässä 300 °Cmin paineella 10 000 psi ja alhaisin ryhmässä 400 °Cmin paineella 10 000 psi. Asteminuuttimäärien kasvaessa molemmilla painemäärillä ryhmien välillä havaittiin pienenemistä elävyyksissä paineella 9000 psi. Paineella 10 000 psi elävyydet olivat keskimäärin suuremmat ryhmissä 100-300 °Cmin.

5.2 Triploidia-aste

Virtaussytometria-analyyseissä käytiin läpi ensimmäisellä ajokerralla yhteensä 250 näytettä (10 näytettä / ryhmä) ja toisella ajokerralla näistä 213 näytettä. Toisen ajokerran pienempi näytemäärä johtui siitä, että osassa näytteitä ei ollut tarpeeksi soluja virtaussytometria-analyysissä (alle 5000). Lisäksi jokaisella analyysiajolla käytettiin yhtä diploidisiikakontrollia. Tulokset käsittelyryhmien triploidia-asteista ja ryhmienvälisistä tilastollisista merkitsevyyksistä on esitetty Kuvassa 7.

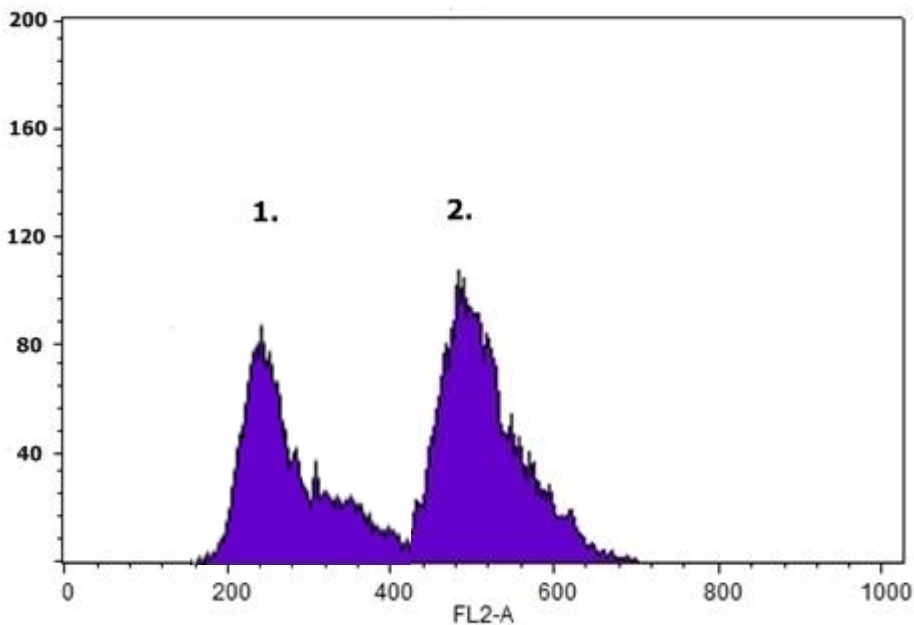
Ensimmäisellä ajokerralla korkein triploidia-aste oli ryhmässä 400 °Cmin paineella 10 000 psi (84 %) ja alhaisin ryhmässä 100 °Cmin paineella 10 000 psi (33 %). Ero näiden ryhmien välillä oli merkitsevä ($p < 0,01$). Ensimmäisellä ajokerralla asteminuuttimäärien kasvaessa ryhmien välillä oli havaittavissa triploidia-asteen tasaista madaltumista paineella 9000 psi. Suurin madaltuminen tapahtui siirryttäessä ryhmään 400 °Cmin. Näin ollen 400 °Cmin paineella 9000 psi on huono vaihtoehto triploidisten siikojen tuottamiseen. Toisin kuin paineella 9000 psi, paineella 10 000 psi triploidia-aste kasvoi tasaisesti asteminuuttimäärien kasvaessa.

Triploidia-asteissa oli eroja ensimmäisen ja toisen ajokerran välillä. Toisella ajokerralla triploidia-aste oli korkein ryhmässä 200 °Cmin paineella 9000 psi (100 %), mutta ryhmissä 100 ja 200 °Cmin paineella 9000 psi triploidia-asteet olivat samaa luokkaa (molemmissa 95 %). Alhaisin triploidia-aste oli ryhmässä 100 °Cmin paineella 10 000 psi (31 %). Toisella ajokerralla asteminuuttimäärien kasvaessa ryhmissä 100-300 °Cmin triploidia-aste oli samaa luokkaa paineella 9000 psi. Kuten ensimmäisellä ajokerralla, suurin madaltuminen tapahtui siirryttäessä ryhmään 400 °Cmin. Asteminuuttimäärien kasvaessa myös paineella 10 000 psi triploidia-aste kasvoi. Suurin kasvu tapahtui 100 ja 200 °Cmin välillä. Tämän jälkeen triploidia-aste madaltui tasaisesti.



Kuva 7. Paineshokkikäsiteltyjen triploidisten siikojen triploidia-asteet prosentteina rinnakkaisissa (A-C) ryhmissä (100-400 °Cmin) kahdessa eri painemäärässä (■=9000 psi ja ■=10 000 psi) ensimmäisellä (7A, n=250) ja toisella (7B, n=213) ajokerralla. Ryhmien näytemäärät on ilmoitettu kuvissa pylväiden alla ilman kontrolleja (n=24 molemmilla ajokerroilla). Triploidia-asteet on määritetty siikojen pakastetuista verinäytteistä Becton Dickinson FACSCalibur –virtaussytometrillä. Ryhmienväliset tilastolliset merkitsevyydet on ilmoitettu kirjainkoodeilla molemmille painemäärille. 7A. $p < 0,01$: a-b; a-g; b-d; b-f; b-h; c-d; c-g; d-h; g-h). 7B. $p < 0,01$: a-b; a-g; b-d; b-f; b-h; c-g; e-g; g-h.

Kokonaisuutena toisella ajokerralla triploidia-asteet olivat korkeammat, vaikka analyyseissä oli samat näytteet (Kuva 7B). Erot triploidia-asteissa johtuivat todennäköisesti virtausytometriatuloksissa havaituista siirtymistä osassa näytteistä (Kuva 8). Koska näytteiden jaottelu diploideihin ja triploideihin tehtiin ajokertakohtaiseen diploidikontrolliin vertaamisen avulla, toisella ajokerralla näytteitä luokiteltiin enemmän triploideiksi johtuen siirtymästä. Siirtymää ei havaittu kontrollinäytteissä. Siirtymään on voinut vaikuttaa esimerkiksi näytteiden varastointi ja näytteiden lukumäärät analyyseissä.



Kuva 8. Propidiumjodidilla värjättyjen siikojen verinäytteiden fluoresenssikuvaajat virtausytometria-analyysin ensimmäisellä (n=250) ja toisella (n=213) ajokerralla. Samaan kuvaan on yhdistetty molempien ajokertojen tuloskuvat. Näytteet olivat ryhmästä 100 B 9000 psi ja ne analysoitiin Becton Dickinson FACSCalibur –virtausytometrillä 13.10.2011 (1.) ja 3.1.2012 (2.).

Verinäytteenotot tehtiin toukokuussa 2011, minkä yhteydessä näytteet pakastettiin (-20 °C) 70 % etanolia sisältäviin 96-kuoppalevyihin. Virtausytometria-analyysit toteutettiin aikavälillä kesäkuu 2011 – tammikuu 2012 ja tällä välin näytteitä varastoitiin pakastimessa (-20 °C). Virtausytometriassa havaitut siirtymät osassa näytteistä ensimmäisen ja toisen ajokerran välillä johtuivat todennäköisesti pakastuksesta. Toinen vaihtoehto suurempiin triploidia-asteisiin toisella ajokerralla voi olla pienemmissä näyttemäärissä, joiden takia triploidia-asteet ovat voineet kasvaa.

Ensimmäisen ja toisen ajokerran tulosten perusteella kokonaisuutena parhaimmat tulokset triploidia-asteissa saatiin ryhmillä 100-300 °Cmin paineella 9000 psi ja näitä asetuksia voisi harkita triploidisten siikojen tuottamiseen. Tulosten perusteella painemääristä on varmempaa valita 9000 psi. Molemmilla ajokerroilla ryhmässä 400 °Cmin 9000 psi:n paineella oli eniten hajontaa triploidia-asteissa. Tulosten perusteella ryhmä 400 °Cmin voi olla huono vaihtoehto triploidisten siikojen tuottamiseen.

6. POHDINTA

Triploidisten siikojen tuottamisesta ei ole aiempaa tieteellistä julkaistua tutkimustietoa. Triploidisaatiossa tärkeitä tekijöitä ovat käytetty shokkimenetelmä, shokin aloitusaika hedelmöityksen jälkeen sekä shokin intensiteetti ja kesto aika (Piferrer ym. 2009). Tässä pro gradu – tutkielmassa kehitettiin menetelmä triploidisten siikojen tuottamiseksi hydrostaattisen paineen avulla. Paineshokin etuja ovat sen tasainen jakautuminen mätimuniin sekä tehokkuus triploidiasaannossa (Maxime 2008). Tutkimuksessa käytettiin neljää asteminuuttiryhmää (100, 200, 300, 400 °Cmin) ja verrattiin kahta eri painemäärää (9000 ja 10 000 psi) 5 minuutin kestoisessa shokissa. Tutkielman tavoitteena oli löytää mahdollisimman hyvän triploidiasaannon sekä elävyyden tuottava käsittely. Triploidian määrittäminen tehtiin virtausytometrialla siikojen pakastetuista verinäytteistä.

6.1 Paineshokkikäsittelyjen vaikutukset kalojen morfologiaan ja elävyyteen

Aiemmissä tutkimuksissa ennen sukukypsyyttä triploidien kalojen kasvu on vaihdellut lajikohtaisesti verrattuna diploideihin kaloihin (Piferrer ym. 2009). Syynä ovat olleet mm. kasvatusolosuhteet ja triploidisaatiossa käytetyt menetelmät sekä sen vaikutukset esimerkiksi kalojen elävyyteen kehityksen aikana.

Tässä tutkielmassa korkeimmat siikojen keskipituudet ja –painot saatiin käsittelyryhmillä 100-300 °Cmin. Yleisesti ryhmien välillä oli merkitseviä eroja sekä pituuksissa että painoissa. Syynä tähän oli suuren kuolleisuuden aiheuttamat erot ryhmäkohtaisissa kalamäärissä. Tämän takia pienemmät allaskohtaiset kalatiheydet johtivat parempaan kasvuun kaikissa ryhmissä kontrolliryhmään verrattuna.

Mätimunaa laadulla on suuri vaikutus alkioiden selviytymiselle (Taylor ym. 2011). Jos triploideja kaloja tuotetaan lisääntymiskauden loppupuolella, selviytyminen voi olla heikompaa johtuen esimerkiksi ylikypsyneistä mätimunista. Tässä tutkielmassa elävyysprosentit olivat alhaiset kaikissa ryhmissä. Eniten kaloja oli elossa kontrolliryhmässä (22 %). Käsittelyryhmistä korkein elävyys oli ryhmässä 300 °Cmin paineella 10 000 psi ($5,6 \pm 2,9$ %) ja alhaisin ryhmässä 400 °Cmin paineella 10 000 psi ($0,7 \pm 0,3$ %). Kaikkien käsittelyryhmien välillä oli merkitsevät erot elävyyksissä ($p < 0,01$). Loopstra & Hansenin (2010) tutkimuksessa triploideilla pohjanharjuksilla korkein elävyys oli ryhmällä 175 °Cmin paineella 8500 psi (79,6 %) ja alhaisin ryhmällä 100 °Cmin paineella 10 000 psi (30 %). Kontrolliryhmien korkein elävyys oli 91,3 % ja alhaisin 65,1 %. Haffray ym. (2007) tutkimuksessa paineshokkiryhmän elävyys oli 81,7 % ja tulos oli verrattavissa kontrolliryhmään. Molempiin tutkimuksiin verrattuna tässä tutkielmassa saatiin selvästi alhaisemmat elävyysprosentit sekä käsittelyryhmissä että kontrolliryhmässä, mikä viittaa siihen, että tutkielmassa käytetty mätierä oli todennäköisesti huonolaatuista. Syynä tähän on voinut olla käytetyissä iäkkäissä emokaloissa ja koirissa, jotka olivat jo todennäköisesti ohittaneet parhaan lisääntymisikänsä.

Mädin haudontalämpötilalla ei havaittu olevan vaikutusta mädin elävyyteen kokeen aikana, vaikka mätiiä haudottiin korkeammilla lämpötiloilla alkionkehityksen nopeuttamiseksi. Elävyyttä ovat voineet heikentää myös mahdolliset mädin huoltotoimenpiteet. Kuolleen mädin poisto tehtiin joka toinen päivä haudonnan aikana lappoletkulla. Kuolleiden mätimunien mukana on voinut poistua myös eläviä mätimunia. Tärkein syy alhaiselle elävyydelle on kuitenkin mädin heikossa laadussa sekä käsittelyryhmille tehdyissä paineshokkikäsittelyissä.

Epämuodostumista havaittiin selkärangan skolioosia, jota oli eniten ryhmässä 300 °Cmin paineella 10 000 psi ($5,4 \pm 4,8$ %). Kontrolliryhmässä skolioosin osuus oli 3,1 % ja ero näiden ryhmien välillä oli merkitsevä ($p < 0,01$). Muissa ryhmissä epämuodostumien osuudet olivat pienet. Tulokset olivat kokonaisuutena samankaltaiset verrattuna Haffray ym. (2007) tutkimukseen, jossa epämuodostumien osuus oli paineshokkiryhmässä 2,8 % ja kontrolliryhmässä 1,9 %.

6.2 Paineshokkikäsittelyjen vaikutukset kalojen triploidia-asteeseen

Kokonaisuutena sekä ensimmäisen että toisen ajokerran perusteella parhaimmat tulokset triploidia-asteissa saatiin ryhmillä 100-300 °Cmin paineella 9000 psi (triploidia-aste välillä 77-100 %). Näitä

asetuksia voisi harkita triploidisten siikojen tuottamiseen. Painemäärien vertailussa vakaampia tuloksia saatiin paineella 9000 psi. Saadut tulokset triploidia-asteissa olivat samansuuntaiset verrattuna optimoituihin menetelmiin. Esimerkiksi Loopstra & Hansenin (2010) tutkimuksessa pohjanharjuksilla triploidia-asteet olivat 100 % kaikilla käsittelyryhmillä. Haffray ym. (2007) tutkimuksessa kirjolohien triploidia-asteet olivat paineshokilla 97,5 % ja lämpöshokilla 92,9 %.

Polyploidia-asteen toteamisessa DNA:n määrää näytteestä mittaava virtaussytometria on nopea ja tarkka menetelmä (Thorgaard ym. 1982; Allen 1983; Lecommandeur ym. 1994). Tässä tutkielmassa virtaussytometria-analyyseissä käytiin läpi ensimmäisellä ajokerralla 250 näytettä ja toisella ajokerralla näistä 213 näytettä. Toisen ajokerran pienempi näytemäärä johtui siitä, että osassa näytteitä ei ollut tarpeeksi punasoluja virtaussytometria-analyysissä (alle 5000). Virtaussytometria-analyyseissä jokainen näyte luokiteltiin yhden analyysiajon perusteella joko diploidiksi tai triploidiksi näytteeksi. Luokittelu tehtiin silmämääräisesti vertaamalla näytteen muodostamaa kuvaajaa kontrollinäytteeseen. Triploidia-asteissa oli eroja ensimmäisen ja toisen ajokerran välillä. Toisella ajokerralla triploidia-asteet olivat korkeammat, vaikka analyyseissä oli samat näytteet. Erot johtuivat todennäköisesti virtaussytometriatuloksissa osassa näytteistä havaituista siirtymistä, mikä on voinut olla seurausta näytteiden pakastuksesta (-20 °C). Yksi syy toisen ajokerran suurempiin triploidia-asteisiin voi olla pienemmissä näytemäärissä, minkä seurauksena myös triploidia-asteet ovat voineet kasvaa.

Triploidisaation onnistuminen ja poikassaanto ovat yhteydessä lukuisiin muuttujiin (Felip ym. 1997), jotka ovat kalalajikohtaisia (Piferrer ym. 2000; Piferrer ym. 2003). Tässä tutkielmassa saatiin tuotettua polyploidisia siikoja. Asteminuuttiryhmien osalta jatkossa voitaisiin keskittyä tarkemmin 100–300 °Cmin alueelle, koska kyseisillä ryhmillä saatiin tässä tutkielmassa korkeimmat triploidia-asteet ja elävyydet. Shokin kestoajan optimoimiseksi jatkossa olisi tärkeää kokeilla lyhyempää tai pidempää shokkia. Painemääristä mielenkiintoista olisi kokeilla alle 9000 psi:n paineita, koska esimerkiksi Loopstra & Hansenin (2010) tutkimuksessa optimaalisin käsittely tehtiin paineella 8500 psi. Yli 10 000 psi:n paineita ei ole perusteltua käyttää lisääntyneen kuolleisuuden välttämiseksi. Koska siika on kylmänveden kalalaji, mielenkiintoinen vaihtoehto olisi myös kokeilla lämpöshokkia triploidisten siikojen tuottamiseksi. Toisaalta Cingi ym. (2010) tutkimuksen mukaan liian suuri veden lämpötila hedelmöitysvaiheessa voi lisätä mätimunien kuolleisuutta ja epämuodostumien esiintyvyyttä. Tämä voisi puoltaa vaihtoehtoisesti kylmähokin käyttöä siian

triploidisaatioissa. Mahdollisissa jatkotutkimuksissa on myös harkittava täydentävän menetelmän käyttöönottoa ploidia-asteen tunnistamisessa (Nousiainen & Granlund 2011).

Siianviljelyn bioteknologiset sovellukset ovat vasta kehitteillä. Siianviljelyn perustana on valintajalostus, jolla parannetaan siian kasvua sekä filelaatua (Quinton ym. 2007; Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos 2008; Kause ym. 2011). Valintajalostukseen yhdistetty triploidisaatio parantaisi mahdollisesti edellä kuvattuja muuttujia steriiliyden avulla, koska triploidiset kalat ovat lisääntymiskyvyttömiä ja voivat käyttää energiansa parempaan kasvuun (Piferrer ym. 2009). Virkistyskalastuksen kannalta triploidit siiat tarjoaisivat istukkaina hyvän lisän esimerkiksi alueilla, joissa luontainen kanta ei riitä vastaamaan kalastustarpeita (High & Meyer 2009). Tulevaisuuden näkymiin liittyy myös yleisesti triploidisaatiomenetelmien kehittäminen kalalajeille, joita se puuttuu. Tämän lisäksi triploideilla kaloilla voi olla käyttöä myös tutkimuksessa, mm. lisääntymisfysiologian mekanismien selvittämisessä (Felip ym. 2009) ja syöpätutkimuksessa (Thorgaard ym. 1999). Yksi vaihtoehto triploidisten kalojen käytölle on myös sijaisemokalakantojen perustamisessa uhanalaisten kalalajien turvaamiseksi (Okutsu ym. 2007).

6.3 Yhteenveto

Triploidisaatiota käytetään vesiviljelyssä steriilien kalojen tuottamiseen. Steriiliys mahdollistaa triploidien kalojen paremman kasvun ja lihanlaadun erityisesti lisääntymiskaudella, jolloin normaaleilla diploideilla kaloilla kasvu ja lihanlaatu heikkenee. Steriilejä kaloja voidaan myös hyödyntää istutuksissa. Tällöin luonnonkalojen geneettinen perimä säilyy, koska triploidit kalat ovat lisääntymiskyvyttömiä. Triploidisaatiota toteutetaan Euroopassa erityisesti lohikaloilla, joista tärkein triploidi tuotantolaji on kirjolohi.

Tässä pro gradu –tutkielmassa kehitettiin menetelmä triploidisten siikojen tuottamiseksi hydrostaattisella paineshokkikäsittelyllä. Tutkielmassa käytettiin neljää asteminuuttiryhmää (100, 200, 300, 400 °Cmin) ja verrattiin kahta eri paineshokkia (9000 ja 10 000 psi). Tavoitteena oli mahdollisimman hyvän triploidiasaannon sekä elävyyden antava käsittely. Polyploidia-asteiden määritykset tehtiin virtaussytometrialla siikojen pakastetuista verinäytteistä samoille näytteille kahdella ajokerralla. Parhaimmat tulokset triploidia-asteissa saatiin ryhmillä 100-300 °Cmin paineella 9000 psi (triploidia-aste välillä 77-100 %). Painemäärien vertailussa vakaampia tuloksia saatiin paineella 9000 psi. Näitä asetuksia voisi harkita triploidisten siikojen tuottamiseen.

Elävyydet olivat alhaiset kaikissa ryhmissä. Eniten kaloja oli elossa kontrolliryhmässä (22 %). Korkein elävyys oli ryhmässä 300 °Cmin paineella 10 000 psi ($5,6 \pm 2,9$ %) ja alhaisin ryhmässä 400 °Cmin paineella 10 000 psi ($0,7 \pm 0,3$ %). Kaikkien käsittelyryhmien välillä oli merkitsevät erot elävyyksissä ($p < 0,01$). Alhaiset elävyysprosentit sekä käsittely- että kontrolliryhmissä viittaavat siihen, että tutkimuksessa käytetty mätierä oli tavanomaista heikkolaatuisempaa, johtuen todennäköisesti käytetyistä iäkkäistä emokaloista ja koiraista, jotka olivat jo ohittaneet parhaan lisääntymisikänsä. Alhainen elävyys ei siis johtunut pelkästään triploidisaatiosta.

Epämuodostumista havaittiin selkärangan skolioosia, jota oli eniten ryhmässä 300 °Cmin paineella 10 000 psi ($5,4 \pm 4,8$ %). Kontrolliryhmässä skolioosin osuus oli 3,1 % ja ero näiden ryhmien välillä oli merkitsevä ($p < 0,01$). Muissa ryhmissä epämuodostumien osuudet olivat pienet.

Siika on toiseksi tärkein viljelty ruokakala Suomessa. Tulevaisuuden mahdollisia jatkotutkimuskohteita siianviljelyssä voisivat olla paineshokkikäsittelyjen optimointi, vaihtoehtoisten triploidisaatiomenetelmien vertailu sekä polyploidia-asteen määrittämenetelmien kehittäminen.

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.
- Argue BJ & Dunham RA, 1999. Hybrid fertility, introgression, and backcrossing in fish. *Rev Fish Sci* 7: 137-195.
- Benfey TJ, 1999. The physiology and behavior of triploid fishes. *Rev Fish Sci* 7: 39–67.
- Benfey TJ, McCabe LE & Pepin P, 1993. 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.
- Billard R, Christen R, Cosson MP, Gatty JL, Letellier L, Renard P & Saad A, 1986. Biology of the gametes of some teleost species. *Fish Physiol Biochem* 2: 115-120.

- Bonnet S, Haffray P, Blanc JM, Vallée F, Vauchez C, Fauré 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.
- Boulanger Y, 1991. Performance comparison of all-female, diploid and triploid brook trout. In proceedings of the Atlantic Canada workshop on methods for the production of non-maturing salmonids, Dartmouth, N.S. *Can Tech Rep Fish Aquat Sci* 1789: 111-121.
- Cal R, Terrones J, Vidal S, Martínez P & Piferrer F, 2010. Differential incidence of gonadal apoptosis in triploid-induced male and female turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 307: 193-200.
- Cal RM, Vidal S, Gómez C, Álvarez-Blázquez B, Martínez P & Piferrer F, 2006. Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 251: 99-108.
- Cantas L, Fraser TWK, Fjellidal PG, Mayer I & Sørum H, 2011. The culturable intestinal microbiota of triploid and diploid juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) – a comparison of composition and drug resistance. *BMC Vet Res* 7: 71.
- Cherfas NB, Gomelsky B, Ben-Dom N, Peretz Y & Hulata G, 1994. Assessment of triploid common carp (*Cyprinus carpio*) for culture. *Aquaculture* 127: 11-18.
- 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.
- Chourrout D & Nakayama I, 1987. Chromosome studies of progenies of tetraploid female rainbow trout. *Theor Appl Genet* 74: 687-692.
- Cingi S, Keinänen M & Vuorinen PJ, 2010. Elevated water temperature impairs fertilization and embryonic development of whitefish (*Coregonus lavaretus*). *J Fish Biol* 76: 502-521.
- 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.
- Cotter D, O'Donovan V, O'Maoiléidigh N, Rogan G, Roche N & Wilkins NP, 2000. An evaluation of the use of triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in minimizing the impact of escaped farmed salmon on wild populations. *Aquaculture* 186: 61-75.

- Devlin RH, Sakhrani D, Biagi CA & Eom KW, 2010. Occurrence of incomplete paternal-chromosome retention in GH-transgenic coho salmon being assessed for reproductive containment by pressure-shock-induced triploidy. *Aquaculture* 304: 66-78.
- Environment Agency, 2009. National trout & grayling fisheries strategy. New rules to protect wild brown trout. Environment Agency, UK.
- Felip A, Carrillo M & Zanuy S, 2009. Older triploid fish retain impaired reproductive endocrinology in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *J Fish Biol* 75: 2657-2669.
- Felip A, Zanuy S, Carrillo M & Piferrer F, 2001a. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica* 111: 175–195.
- Felip A, Piferrer F, Carrillo M & Zanuy S, 2001b. A 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, 2001c. Comparison of the gonadal development and plasma sex steroid hormones in diploid and triploid sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *J Exp Zool* 290: 384-395.
- 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, Zanuy S, Carrillo M & Piferrer F, 1999. Growth and gonadal development in triploid sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 173: 389-399.
- Flajšhans M, Gela D, Kocour M, Buchtová H, Rodina M, Pšenička M, Kašpar V, Piačková V, Sudová E & Linhart O, 2010. A review on the potential of triploid tench for aquaculture. *Rev Fish Biol Fish* 20: 317-329.
- Fleming IA, 1996. Reproductive strategies of Atlantic salmon: ecology and evolution. *Rev Fish Biol Fish* 6: 379-416.
- Fopp-Bayat D & Woznicki P, 2006. Verification of ploidy level in sturgeon larvae. *Aquacult Res* 37: 1671-1675.
- 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 & Samples BL, 2000. Optimization of thermal shock protocols for induction of triploidy in brook trout. *N Am J Aquacult* 62: 249-259.

- Galbreath PF & Thorgaard GH, 1995. Saltwater performance of all female triploid Atlantic salmon. *Aquaculture* 138: 77–85.
- 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.
- Ghigliotti L, Bolla SL, Duc M, Ottesen OH & Babiak I, 2011. Induction of meiotic gynogenesis in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) through pressure shock. *Anim Reprod Sci* 127: 91-99.
- 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.
- Gomelsky B, 2003. Chromosome set manipulation and sex control in common carp: a review. *Aquat Living Resour* 16: 408–415.
- Haffray P, Aubin J, Houis V, Labbe L & Jalabert B, 2007. Comparison of pressure or thermal treatments on triploid yields and malformations up to swim stage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 272: 265.
- Haffray P, Bruant J-S, Facqueur J-M & Fostrier A, 2005. Gonad development, growth, survival and quality traits in triploids of the protandrous hermaphrodite gilthead seabream *Sparus aurata* (L.). *Aquaculture* 247: 107-117.
- Hershberger W & Hostuttler M, 2007. Protocols for more effective induction of tetraploid rainbow trout. *N Am J Aquacult* 69: 367-372.
- High B & Meyer KA, 2009. Survival and dispersal of hatchery triploid rainbow trout in an Idaho river. *N Am J Fish Manage* 29: 1797-1805.
- Hulata G, 2001. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica* 111: 155-173.
- Ihssen PE, McKay LR, McMillan I & Phillips RB, 1990. Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries applications. *T Am Fish Soc* 119: 698-717.
- Jørstad KE, Van Der Meeren T, Paulsen OI, Thomsen T, Thorsen A & Svåsand T, 2008. “Escapes” of eggs from farmed cod spawning in net pens: recruitment to wild stocks. *Rev Fish Sci* 161: 285-295.
- Järvi T, 1990. The effects of male dominance, secondary sexual characteristics and female mate choice on the mating success of male Atlantic salmon *Salmo salar*. *Ethology* 84: 123-32.

- 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.
- Kause A, Quinton C, Airaksinen S, Ruohonen K & Koskela J, 2011. Quality and production trait genetics of farmed European whitefish, *Coregonus lavaretus*. *J Anim Sci* 89: 959-971.
- Komen H & Thorgaard GH, 2007. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review. *Aquaculture* 269: 150-173.
- Koskela J, Määttä V, Vielma J, Rahkonen R, Forsman L, Setälä J & Honkanen A, 2002. Siian kasvatus ruokakalaksi. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos.
- Kozfkay JR, Dillon JC & Schill DJ, 2006. Routine use of sterile fish in salmonid sport fisheries: are we there yet? *Fisheries* 8: 392-401.
- Kozfkay JR, Wagner EJ & Aplanalp D, 2005. Production of triploid lake trout by means of pressure treatment. *N Am J Aquacult* 67: 93-97.
- Lamatsch DK, Steinlein C, Schmid M & Scharl M, 2000. Non-invasive determination of genome size and ploidy level in fishes by flow cytometry: detection of triploid *Poecilia Formosa*. *Cytometry* 39: 91-95.
- Le Comber S & Smith C, 2004. Polyploidy in fishes: patterns and processes. *Biol J Linn Soc* 82: 431-442.
- Lecommandeur D, Haffray P & Philippe L, 1994. Rapid flow cytometry method for ploidy determination in salmonoid eggs. *Aquac Res* 25: 345-350.
- Leclercq E, Taylor JF, Fison D, Fjelldal PG, Diez-Padriza M, Hansen T & 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.
- Leggatt RA & Iwama GK, 2003. Occurrence of polyploidy in the fishes. *Rev Fish Biol Fish* 13: 237-246.
- Leggatt RA, Scheer KW, Afonso LOB & Iwama GK, 2006. Triploid and diploid rainbow trout do not differ in their stress response to transportation. *N Am J Aquacult* 68: 1-8.
- Lemoine HL Jr & Smith LT, 1980. Polyploidy induced in brook trout by cold shock. *Trans Am Fish Soc* 109: 626-631.
- Li Y, Li X & Qin JG, 2007. Triploidy induction in Australian greenlip abalone *Haliotis laevigata* (Donovan) with cytochalasin B. *Aquac Res* 38: 487-492.
- Liu W, Heasman M & Simpson R, 2004. Induction and evaluation of triploidy in the Australian blacklip abalone, *Haliotis rubra*: a preliminary study. *Aquaculture* 233: 79-92.

- Loopstra DP & Hansen PA, 2010. Induction of triploidy in arctic grayling (*Thymallus arcticus*) using hydrostatic pressure. Fishery Data Series no. 10-55. Alaska Department of Fish and Game.
- Loopstra DP & Hansen PA, 2008. Induction of triploidy in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using hydrostatic pressure. Fishery Data Series no. 8-22. Alaska Department of Fish and Game.
- Luo K, Xiao J, Liu S-J, Wang J, He W, Hu J, Qin Q, Zhang C, Tao M & Liu Y, 2011. Massive production of all-female diploids and triploids in the Crucian carp. *Int J Biol Sci* 7: 487-495.
- 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.
- Manning AJ, Burton MPM & Crim LW, 2004. Reproductive evaluation of triploid yellowtail flounder, *Limanda ferruginea* (Storer). *Aquaculture* 242: 625-640.
- Matos I, Sucena É, Machado MP, Gardner R, Inácio Â, Scharl M & Coelho MM, 2011. Ploidy mosaicism and allele-specific gene expression differences in the allopolyploid *Squalius alburnoides*. *BMC Genet* 12: 1471-2156.
- Maxime V, 2008. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish Fish* 9: 67-78.
- McCarthy ID, Carter CG, Houlihan DF, Johnstone R & Mitchell AI, 1996. The performance of all-female diploid and triploid Atlantic salmon smolts on transfer together to sea water. *J Fish Biol* 48: 545-548.
- McClure CA, Hammell KL, Moore M, Dohoo IR & Burnley H, 2007. Risk factors for early sexual maturation in Atlantic salmon in seawater farms in New Brunswick and Nova Scotia, Canada. *Aquaculture* 272: 370-379.
- McGeachy SA, Benfey TJ & Friars GW, 1995. Freshwater performance of triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) in New Brunswick aquaculture. *Aquaculture* 137: 333-341.
- McIntyre CM, 2008. Water quality and welfare assessment on United Kingdom trout farms. 203 s. PhD-thesis. Institute of Aquaculture, University of Sterling, United Kingdom.
- Myers JM & Hershberger WK, 1991. Early growth and survival of heat-shocked and tetraploid-derived triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 96: 97–107.
- Nam YK & Kim DS, 2004. Ploidy status of progeny from the crosses between tetraploid males and diploid females in mud loach (*Misgurnus mizolepis*). *Aquaculture* 236: 575-582.

- Naylor R, Hindar K, Fleming IA, Goldberg R, Williams S, Volpe J, Whoriskey F, Eagle J, Kelso D & Mangel M, 2005. Fugitive salmon: assessing the risks of escaped fish from net-pen aquaculture. *Bioscience* 55: 427-437.
- Noble C, Jones HAC, Damsgård B, Flood MJ, Midling KØ, Roque A, Sæther B-S & Cottee SY, 2012. Injuries and deformities in fish: their potential impacts upon aquacultural production and welfare. *Fish Physiol Biochem* 38: 61-83.
- Nousiainen A & Granlund L, 2011. Polyploidisten kirjolohien (*Oncorhynchus mykiss*) tuottaminen ja polyploidian toteaminen punasoluanalyseilla. Biotieteiden tutkimusprojektin loppuraportti. 28 s. Biotieteiden laitos, Itä-Suomen yliopisto, Kuopio.
- Ochatt SJ, 2006. Flow cytometry (ploidy determination, cell cycle analysis, DNA content per nucleus). *Medicago truncatula* handbook.
- 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.
- Okutsu T, Shikina S, Kanno M, Takeuchi Y & Yoshizaki G, 2007. Production of triploid offspring from triploid salmon parents. *Science* 317: 1517.
- 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.
- Øverli Ø, Harris CA & Winberg S, 1999. Short-term effects of fights for social dominance and the establishment of dominant-subordinate relationships on brain monoamines and cortisol in rainbow trout. *Brain Behav Evol* 54: 263-275.
- 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.
- Peruzzi, 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, 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197: 229-281.
- 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.
- Piferrer F, Benfey TJ & Donaldson EM, 1994. Production of female triploid coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by pressure shock and direct estrogen treatment. *Aquat Living Resour* 7: 127-131.
- Piferrer F, Cal RM, Álvarez-Blázquez B, Sánchez L & Martínez P, 2000. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*). I. Ploidy determination and the effects of cold shocks. *Aquaculture* 188: 79–90.
- Piferrer F, Cal RM, Gómez C, Bouza, C & Martínez,P, 2003. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*), II. Effects of cold shock timing and induction of triploidy in a large volume of eggs. *Aquaculture* 220: 821–831.
- Quinton CD, Kause A, Koskela J & Ritola O, 2007. Breeding salmonids for feed efficiency in current fishmeal and future plant-based diet environments. *Genet Sel Evol* 39: 431-446.
- Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos, 2008. Valintajalostusohjelman kehittäminen ruokakalaksi kasvatettavan siian ominaisuuksien parantamiseksi – loppuraportti. 20 s.
- Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos, 2011. Vesiviljely 2010. Riista- ja kalatalous – tilastoja 5/2011. Suomen virallinen tilasto – maa-, metsä- ja kalatalous. 26 s.
- 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.
- Schafhauser-Smith D & Benfey TJ, 2001. The reproductive physiology of three age classes of adult female diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Fish Physiol Biochem* 25: 319-333.
- Sebert P, 2002. Fish at high pressure: a hundred year history. *Comp Biochem Physiol A* 131: 575-585.
- Sellers MJ, Degnan BM & Preston NP, 2006. Production of triploid Kuruma shrimp, *Marsupenaeus (Penaeus) japonicus* (Bate) nauplii through inhibition of polar body I, or polar body I and II extrusion using 6-dimethylaminopurine. *Aquaculture* 256: 337-345.
- Sheehan RJ, Shasteen SP & Suresh AV, 1999. Better growth in all-female diploid and triploid rainbow trout. *Trans Am Fish Soc* 128: 491-498.

- Stöck M, Lamatsch DK, Steinlein C, Eppeln JT, Grosse WR, Hock R, Klapperstück T, Lampert KP, Scheer U, Schmid M & Scharl M, 2002. A bisexually reproducing all-triploid vertebrate. *Nat Genet* 30: 325-328.
- Swarup H, 1959. Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus* (L.). *J Genet* 56: 143-155.
- Taranger GL, Carrillo M, Schulz RW, Fontaine P, Zanuy S, Felip A, Weltzien FA, Dufour S, Karlsen Ø, Noberg B, Andersson E & Hansen T, 2010. Control of puberty in farmed fish. *Gen Comp Endocr* 165: 483-515.
- Taylor JF, Preston AC, Guy D & Migaud H, 2011. Ploidy effects on hatchery survival, deformities, and performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 315: 61-68.
- Thorgaard GH, Arbogast DN, Hendricks JD, Pereira CB & Bailey GS, 1999. Tumor suppression in triploid trout. *Aquat Toxicol* 46: 121-126.
- Thorgaard GH & Jazwin ME, 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. *Trans Am Fish Soc* 110: 546-550.
- Thorgaard GH, Rabinovitch PS, Shen MW, Gall GAE, Propp J & Utter FM, 1982. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. *Aquaculture* 29: 305-309.
- Tiwary BK, Kirubakaran R & Ray AK, 2004. The biology of triploid fish. *Rev Fish Biol Fish* 14: 391-402.
- Wagner EJ, Arndt RE, Routledge MD, Latremouille D & Mellenthin RF, 2006. Comparison of hatchery performance, agonistic behaviour, and poststocking survival between diploid and triploid rainbow trout of three different Utah strains. *N Am J Aquacult* 68: 63-73.
- Warrillow JA, Josephson DC, Youngs WD & Krueger CC, 1997. Differences in sexual maturity and fall emigration between diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*) in an Adirondack lake. *Can J Fish Aquat Sci* 54: 1808-1812.
- Wilkins NP, Cotter D & O'Maoláidigh N, 2001. Ocean migration and recaptures of tagged, triploid, mixed-sex and all-female Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) released from rivers in Ireland. *Genetica* 111: 197-212.
- Yamamoto A & Iida T, 1994. Oxygen consumption and hypoxic tolerance of triploid rainbow trout. *Fish Patol* 29: 245-251.
- Yoshikawa H, Morishima K, Fujimoto T, Arlas-Rodriguez L, Yamaha E & Arai K, 2008. Ploidy manipulation using diploid sperm in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* : a review. *J Appl Ichthyol* 24: 410-414.

Zou S, Li S, Cai W, Zhao J & Yang H, 2004. Establishment of fertile tetraploid population of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Aquaculture* 238: 155-164.

LIITTEET

Pro gradu -tutkielma

LIITE 1. PAINESHOKKILAITTEISTO

LIITE 2. PROTOKOLLAT

PAINESHOKKILAITTEISTO

Paineshokki toteutetaan laitteistolla, johon kuuluvat typpikaasusäiliö, kontrolloyksikkö sekä triploidiakammio, jonka hydrostaattinen paine tuotetaan mekaanisen pumpun avulla (Kuva 9). Triploidiakammio täytetään aluksi vedellä. Hedelmöitetty mätimunat laitetaan kammioon vettä täynnä olevassa metallisessa sylinterissä (maksimitilavuus 3 l). Triploidiakammion kansi suljetaan ja paineshokki aloitetaan haluttuna aikana hedelmöityksestä alkaen. Kyseisessä laitteistossa triploidiakammion paine tuotetaan ja ylläpidetään nestepumpulla, joka saa käyttövoimansa typpikaasusta. Shokin keston täytyttyä typpikaasun tulo suljetaan ja paine lasketaan hitaasti kontrolloyksiköstä. Mädit poistetaan triploidiakammioista ja kuljetetaan haudontaan.



Kuva 9. Paineshokkiin käytettävä laitteisto Tervon RKTL:n laitoksella. Kaasukäyttöisen (1) nestepumpun (2) tuottama hydrostaattinen paine ohjataan triploidiakammioon (3), jonne vastahedelmöitetty mätimunat aluksi laitetaan. Kuva: A. Nousiainen 2010, RKTL Tervo.

PROTOKOLLAT

2 A. Verinäytteenotto

2 B. Työohje pakasteverinäytteen käsittelystä virtausytometrille

2 C. Alkionäytteen valmistaminen virtausytometriajoa varten (50-100 d°C)

2 D. Alkionäytteen valmistaminen virtausytometriajoa varten (170-340 d°C)

2 E. Alkionäytteen valmistaminen virtausytometriajoa varten (340 d°C)

2 A. Verinäytteenotto

TARVIKKEET

Nukutukseen: 0,1 g/l MS-222 (=trikaiini metyyli sulfonaatti) + 0,1 g/l NaHCO₃ (ruokasooda)

96-kuoppalevyjä, joissa valmiina 160 µl jääkylmää 70% EtOH (pakastenäytteille)

Jäätä, kylmäblokki (-20 °C)

Vaaka & pituudenmittauslauta

Sakset, pinsetit

Pipetti, pipetinkärkiä

Muistiinpanovälineet (vihko, lyijykynä)

TYÖN SUORITUS

1. Valmistele pöytä ja välineet näytteenottoa varten. 96-kuoppalevy tulee olla jäällä näytteenoton ajan.
2. Valmista nukutusliuos saaviin ja sekoita hyvin. Hae kalat saavilla näytteenottopaikalle.
3. Mittaa nukutetusta kalasta paino ja pituus sekä epämuodostumat.
4. Siirrä kala näytteenottoalustalle. Ota pinseteillä tukeva ote kalasta ja leikkaa pyrstö poikki pyrstönkaulasta. Upota katkaisukohta nopeasti 96-kuoppalevyllä olevaan kaivoon (nestepinnan läpi) ja valuta verinäyte etanoliin.
5. Sekoita verinäyte pipetoimalla näytettä muutaman kerran.
6. Laita lopuksi siilaukskalvo 96-kuoppalevyn päälle ja varastoi näytteet pakkaseen (-20 °C).

2 B. Työohje pakasteverenäytteen käsittelystä virtausytometrille

TARVIKKEET

1 x PBS, kylmä (säilytys jääkaapissa +4 °C)

1 x PBS (sis. 0,1 % Triton X-100) (säilytys jääkaapissa +4 °C)

Propidiumjodidi (PI) (Invitrogen™) 20 µg/ml, kantaliuos 1 mg/ml (säilytys jääkaapissa +4 °C)

1.5 ml mikrosentrifugiputkia

Virtausytometriputkia (BD Falcon)

Näytteiden valmistus pakasteverenäytteestä

Valmista ennakkoon 1 x PBS sekä 1 x PBS (0,1 % Triton X-100).

1. Ota 50 µl pakastenäytettä -20 °C säilytyksestä ja vorteksoi pikaisesti.

2. Sentrifugoi 5 min 400 g.

3. Pese näytettä 2 x 200 µl:lla jääkylmällä 1 x PBS:llä, vorteksoi välillä pikaisesti ja sentrifugoi (a'5 min 400 g). Pesu kylmäblokillä, joka on jäähdytetty jääkaapissa.

4. Pesun aikana valmista näytteiden värjäystä varten 1 x PBS (0,1 % Triton X-100) + 20 µg/ml PI – liuos ja peitä putki foliolla. Esimerkiksi 24 näytteelle tarvitaan seuraava liuos:

$$100 \mu\text{l} * 25 = 2500 \mu\text{l} \text{ (pipetointivaran kanssa)}$$

$$20 \mu\text{g/ml} * 2,5 \text{ ml} = 50 \mu\text{g} \rightarrow \text{PI-kantaliuos } 1 \mu\text{g}/\mu\text{l} \rightarrow 50 \mu\text{l}$$

$$\rightarrow \text{PI: } 50 \mu\text{l} + 1 \text{ x PBS-liuos (0,1 \% Triton X-100): } 2450 \mu\text{l}$$

5. Pipetoi 100 µl tehdystä värjäysliuoksesta näytteen sekaan ja vorteksoi pikaisesti. Inkuboi näytettä 15-20 min pimeässä ja jäällä. Ajoita värjäys siten, että inkuboinnin päätyttyä olet heti aloittamassa virtausytometriaajoa.

6. Inkuboinnin aikana pipetoi virtausytometriputkien pohjalle 200 µl kylmää 1 x PBS:ää. Huom! Jos näytteitä on paljon, niin tämä työvaihe kannattaa tehdä ensin ja lauttaa putket jääkaappiin odottamaan. Ennen virtausytometriaajoa pipetoi virtausytometriputkiin 50 µl näytesupernatanttia (vältä sekoittamasta pohjapellettiä). Tarkoituksena on laimentaa näytteiden solut, jotta virtausytometri ei tukkeudu.

7. Aja näytteet virtausytometrillä (Becton Dickinson FACSCalibur). Näytteistä mitataan 10 000 tuman pinta-alat. Virtausytometria-analyysiin käytetään laitteiston vieressä olevaa ohjetta ja Becton Dickinson CellQuest Pro –ohjelmistoa (Taulukko 4).

Taulukko 4. Becton Dickinson CellQuestPro –ohjelmiston asetukset virtaussytometria-analyysiin. Oletusasetuksista muutetut arvot ovat tummennettuina.

Detectors/amps:					Threshold:	
Param	Detector	Voltage	Gain	Mode	Primary	Secondary
			Amp.			
P1	FSC	E00	1.00	Lin	Value: param:	param:
P2	SSC	350	1.00	Lin	52	
P3	FL1	600	1.00	Lin	52	
P4	FL2	433	1.00	Lin	52	
P5	FL3	650	1.00	Lin	10	FL2-H
P6	FL2-A		1.00	Lin	52	
P7	FL2-W		2.79	Lin	52	
						None

2 C. Alkionäytteen valmistaminen virtaussytometriaa varten (50-100 d°C)

Tämä protokolla soveltuu varhaisalkiolle, joiden kehitys on 50-100 d°C.

1. Siirrä tuore mätimuna pinseteillä petrimaljalle (väh. 60 mm halkaisija) ja lisää päälle hieman jääkylmää 1 x PBS:ää.
2. Poista alkio mätimunän sisältä huolellisesti neulan ja saksien sekä pinsettien avulla. Käytä apuna preparoinnissa mikroskooppia, jotta alkio saadaan varmasti talteen. Siirrä alkio 12 kuoppalevyllä PBS:ään, kunnes koko näytesarja on preparoitu. Poista PBS pipetillä kuoppalevyltä ja lisää näytteen päälle 50 µl 1 x trypsiini / EDTA –liuosta.
3. Inkuboi näytettä 10 min + 37 °C lämpötilassa. Laita inkuboinnin ajaksi kansi 12 kuoppalevyn päälle ja resuspendoi näytettä tarvittaessa, jotta näytteestä tulisi mahdollisimman homogeeninen.
4. Pipetoi näyte inkuboinnin jälkeen 1.5 ml mikrosentrifugiputkeen. Huuhtele näytteen kuoppalevyä 250 µl PBS:llä ja pipetoi neste huuhtelun jälkeen mikrosentrifugiputkeen.
5. Sentrifugoi näyte (3 min 700 G) ja valmista propidiumjodidi-liuos (PI). Esim. 5 näytteelle:
 - 100 µl * 6 = 600 µl (pipetointivaran kanssa)
 - 20 µg / ml * 0,6 ml = 12 µg → PI-kantaliuos 1 µg / µl → 12 µl
 - 12 µl propidiumjodidia + 588 µl 1 x PBS (0,1 % Triton X-100).
6. Sentrifugoinnin jälkeen poista supernatantti varovaisesti ja lisää pelletin päälle 100 µl valmistettua PI-liuosta. Inkuboi 30 min pimeässä ja jäällä. Huom! Liian pitkä inkuboitumisaika voi huonontaa FCM-tuloksia.
7. PI-inkuboinnin aikana valmistelee virtaussytometriputket. Pipetoi putkiin 400 µl jääkylmää 1 x PBS:ää ja viimeistään 30 min kuluttua inkuboinnin aloittamisesta 100 µl näytesupernatanttia. Tarkoituksena on laimentaa näytteet, jotta virtaussytometri ei tukkeudu.
8. Vorteksoi näytteet juuri ennen FCM-ajoa. Aja näytteet virtaussytometrillä (Becton Dickinson FACSCalibur). Näytteistä mitataan 10 000 tuman pinta-alat. Virtaussytometria-analyysiin käytetään laitteiston vieressä olevaa ohjetta ja Becton Dickinson CellQuest Pro –ohjelmistoa (Taulukko 4).

2 D. Alkionäytteen valmistaminen virtaussytometriaa varten (170-340 d°C)

Tämä protokolla soveltuu alkioille, jonka kehitys on silmäpistevaiheen (170 d°C) ja kuoriutumisen (340 d°C) välillä.

1. Siirrä tuore mätimuna pinseteillä petriمالjalle ja lisää päälle hieman jääkylmää 1 x PBS:ää.
2. Poista alkio mätimunasta neulan ja skalpellin sekä pinsettien avulla. Poista myös ruskuaispussi. Siirrä alkio 12 kuoppalevyille ja lisää näytteen päälle 200 µl 1 x trypsiini / EDTA –liuosta.
3. Pilko alkio saksilla ja inkuboi 10-20 min + 37 °C lämpötilassa. Laita inkuboinnin ajaksi kansi 12 kuoppalevyn päälle ja resuspendoi näytettä tarvittaessa, jotta näytteestä tulisi mahdollisimman homogeeninen. Solujen erottumista seurataan tarvittaessa mikroskoopilla.
4. Inkuboinnin jälkeen pipetoi näyte suodattimen (BD Falcon 40 µm) läpi uudelle petriمالjalle. Lisää suodattimelle 200 µl 1 x PBS ja 800 µl 1 x PBS entiselle näyttemaljalle ja pipetointi suodattimen läpi, jotta kaikki solut saadaan talteen. Huom! Suodattimen pohjaan jää helposti pisaroita, eli ota nekin mukaan.
5. Pipetoi näyte petriمالjalta 1.5 ml mikrosentrifugiputkeen. Sentrifugoi (3 min 400 G) ja valmista propidiumjodidi-liuos (PI). Esim. 5 näytteelle:

$$200 \mu\text{l} * 6 = 1000 \mu\text{l} = 1200 \mu\text{l} \text{ (pipetointivaran kanssa)}$$

$$20 \mu\text{g} / \text{ml} * 1,2 \text{ ml} = 24 \mu\text{g} \rightarrow \text{PI-kantaliuos } 1 \mu\text{g} / \mu\text{l} \rightarrow 24 \mu\text{l}$$

$$\rightarrow 24 \mu\text{l propidiumjodidia} + 1176 \mu\text{l } 1 \text{ x PBS (0,1 \% Triton X-100)}.$$
6. Sentrifugoinnin jälkeen poista supernatantti ja lisää näytteen päälle 200 µl tehtyä PI-liuosta. Inkuboi 30 min pimeässä ja jäällä. Huom! Liian pitkä inkuboitumisaika voi huonontaa FCM-tuloksia.
7. PI-inkuboinnin aikana valmistelet virtaussytometriputket. Pipetoi putkiin 400 µl jääkylmää 1 x PBS:ää ja viimeistään 30 min kuluttua inkuboinnin aloittamisesta 100 µl näytesupernatanttia. Tarkoituksena on laimentaa näytteet, jotta virtaussytometri ei tukkeudu.
8. Vorteksoi näytteet juuri ennen FCM-ajoa. Aja näytteet virtaussytometrillä (Becton Dickinson FACSCalibur). Näytteistä mitataan 10 000 tuman pinta-alat. Virtaussytometria-analyysiin käytetään laitteiston vieressä olevaa ohjetta ja Becton Dickinson CellQuest Pro –ohjelmistoa (Taulukko 4).

2 E. Alkionäytteen valmistaminen virtausytometriaa varten (340 d°C)

Tämä protokolla soveltuu kuoriutuneelle (yli 340 d°C) alkiolle.

1. Lopeta kala nukutusaineella (MS-222). Siirrä kala petrimaljalle ja lisää päälle hieman jääkylmää 1 x PBS:ää.
2. Poista pää ja ruskuaispussi skalpellin sekä pinsettien avulla. Siirrä kala 12 kuoppalevyille ja lisää näytteen päälle 200 µl 1 x trypsiini / EDTA –liuosta.
3. Pilko kala saksilla ja inkuboi 40 min + 37 °C lämpötilassa. Laita inkuboinnin ajaksi kansi 12 kuoppalevyn päälle ja resuspendoi näytettä tarvittaessa, jotta näytteestä tulisi mahdollisimman homogeeninen. Solujen erottumista seurataan tarvittaessa mikroskoopilla.
4. Inkuboinnin jälkeen pipetoi näyte suodattimen (BD Falcon 40 µm) läpi uudelle petrimaljalle. Lisää heti perään suodattimelle 400 µl 1 x PBS ja 400 µl 1 x PBS entiselle näytemaljalle ja pipetointi suodattimen läpi, jotta kaikki solut saadaan talteen. Huom! Suodattimen pohjaan jää helposti pisaroita, eli ota nekin mukaan.
5. Pipetoi näyte petrimaljalta 1.5 ml mikrosentrifugiputkeen. Sentrifugoi (5 min 400 G) ja valmista propidiumjodidi-liuos (PI). Esim. 5 näytteelle:
 - 200 µl * 6 = 1000 µl = 1200 µl (pipetointivaran kanssa)
 - 20 µg / ml * 1,2 ml = 24 µg → PI-kantaliuos 1 µg / µl → 24 µl
 - 24 µl propidiumjodidia + 1176 µl 1 x PBS (0,1 % Triton X-100).
6. Sentrifugoinnin jälkeen poista supernatantti ja lisää näytteen päälle 200 µl tehtyä PI-liuosta. Inkuboi 30 min pimeässä ja jäällä. Huom! Liian pitkä inkuboitumisaika voi huonontaa FCM-tuloksia.
7. PI-inkuboinnin aikana valmistelet virtausytometriputket. Pipetoi putkiin 400 µl jääkylmää 1 x PBS:ää ja viimeistään 30 min kuluttua inkuboinnin aloittamisesta 100 µl näytesupernatanttia. Tarkoituksena on laimentaa näytteet, jotta virtausytometri ei tukkeudu.
8. Vorteksoi näytteet juuri ennen FCM-ajoa. Aja näytteet virtausytometrillä (Becton Dickinson FACSCalibur). Näytteistä mitataan 10 000 tuman pinta-alat. Virtausytometria-analyysiin käytetään laitteiston vieressä olevaa ohjetta ja Becton Dickinson CellQuest Pro –ohjelmistoa (Taulukko 4).