

Pro gradu -tutkielma

**Saimaan järvilohen (*Salmo salar m. sebago*)
sukutuotteiden säilytysajan vaikutus jälkeläisten
varhaiseen elinkelpoisuuteen**

Juha-Pekka Turcka



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

26.09.2022

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Akvaattisten tieteiden maisteriohjelma

Turkka Juha-Pekka Saimaan järvilohen (*Salmo salar* m. *sebago*)
sukutuotteiden säilytysajan vaikutus jälkeläisten
varhaiseen elinkelpoisuuteen
Pro gradu tutkielma: 24 s., 1 liite (2 s.)
Työn ohjaajat: FT Anssi Karvonen ja FT Matti Janhunen
Tarkastajat: FT Juhani Pirhonen ja FT Anssi Karvonen
Syyskuu 2022

Hakusanat: Jälkeläisten elinvoimaisuus, maidin säilytys, mädin säilytys, pH,
siittiöiden liikeanalyysi, sukutuotteiden laatu, säilytysviljely,
uhanalaisuus

Saimaan järvilohen (*Salmo salar* m. *sebago*) säilyminen Suomen eläimistöissä alkuperäisenä ja geneettisesti omana kantanaan on ollut Pielisjoen Kuurnan voimalaitoksen rakentamisesta (1971) lähtien täysin vesiviljelyn ja istutusten varassa. Luonnonvarakeskuksen (Luke) Enonkosken kalanviljelylaitoksella säilytetään äärimmäisen uhanalaiseksi luokitellun Saimaan järvilohen emokalastoja. Nykyään kannan säilymisen edellytyksenä on luonnosta pyydettyjen emokalojen sukutuotteet, joista perustetaan kasvatukseen vuosittain aina uusi emoparvi-ikäluokka. Emokalojen kutunousu ja kalojen sukukypsyminen tapahtuu usein pitkällä aikavälillä, jonka vuoksi sukutuotteita joudutaan säilyttämään jopa muutamia viikkoja ennen mädin hedelmöityksiä. Pitkät säilytysajat voivat heikentää hedelmöitystulosta ja alkioiden varhaiskehitystä, jolloin joidenkin emojen jälkeläisiä voidaan menettää kokonaan, ja siten emokalaston geneettinen monimuotoisuus pienenee. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää järvilohen sukutuotteiden säilytysajan vaikutusta jälkeläisten varhaiseen elinkelpoisuuteen (poikasten normaali kehitys ja elossa säilyminen). Mädin ovaarionesteen pH-arvoa seurattiin kahden viikon säilytysjakson aikana. Maidin laadun muutosta seurattiin säilytyksen aikana tietokoneavusteisen siittiöiden liikkuvuusanalyysin (CASA) avulla. Emokalojen paritukset suoritettiin matriisihedelmöityksin ja jokainen yhdistelmä (täysperhe) haudottiin erillisissä haudontayksiköissä. Näin aineistosta voitiin arvioida myös vanhempien suhteellisia vaikutuksia jälkeläisten varhaista elinkykyä kuvaaviin ominaisuuksiin. Sukutuotteiden säilytysajan pidentyessä alkioiden elinkyky, ovaarionesteiden pH-arvot sekä siittiöiden liikkuvuus ja uintinopeus laskivat merkittävästi. Poikasten elinkyvyssä eri naaraiden ja naaras-koirasyhdistelmien (perheiden) välillä oli ajan suhteen merkittävää vaihtelua. Myös siittiöiden liikkuvuus naaraiden ovaarionesteessä aktivoituna vaihteli merkittävästi ajan suhteen eri koiraiden ja perheiden välillä. Tulosten perusteella järvilohen sukutuotteiden säilyttäminen vähentää jälkeläisten elinkykyä, joten sukutuotteiden säilytysaika on mahdollisuuksien mukaan syytä minimoida.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science
Department of Biological and Environmental Science
Master's Degree Programme in Aquatic Sciences

Turkka Juha-Pekka Effect of storage time of eggs and sperm of Saimaa
landlocked salmon (*Salmo salar m. sebago*) on early
development of the offspring
MSci Thesis: 24 p., 1 appendix (2 p.)
Supervisors: PhD Anssi Karvonen and PhD Matti Janhunen
Inspectors: PhD Juhani Pirhonen and PhD Anssi Karvonen
Syyskuu 2022

Keywords: alevin viability, captive broodstock, chilled storage, pH,
postovulatory ageing, sperm motility analysis

In recent years, an increasing number of wild fish species and populations have declined due to human activities. The critically endangered Saimaa landlocked salmon (*Salmo salar m. sebago*) has been dependent on stockings of hatchery-reared juveniles since the building of Kuurna hydroelectric power plant in River Pielisjoki in 1971. Enonkoski aquaculture station of the Natural Resources Institute Finland (Luke) maintains the hatchery broodstocks of the Saimaa landlocked salmon, which are renewed annually using wild-caught spawners (founders) from the River Pielisjoki and periodically from the River Lieksanjoki. Short-term post-stripping storage of eggs and sperm lasting up to a few weeks is typically needed before fertilizations. Variable storage periods can decrease fertilization success and early embryonic development. It is possible that the offspring of some founders are completely lost, which decreases genetic diversity of the broodstock. The aim of this study was to investigate the effect of storage time of landlocked salmon gametes on early viability of offspring (normal development and survival of the alevins). The pH of ovarian fluid was monitored during the storage period of two weeks. The change in quality of sperm was monitored using computer-assisted sperm motility analysis (CASA). Founder matings were performed using full-factorial designs and each combination (full-sib family) was incubated in separate hatching units. This allowed evaluation of the relative influence of parents (male and female) on the early viability traits of the offspring. The viability of embryos, the pH values of ovarian fluids and the motility and swimming speed of sperm decreased significantly with increasing storage time of the gametes. There was also significant variation in the viability of the offspring between different females and families. The change in sperm motility (activated in ovarian fluids) also varied significantly between different males and families. The results suggest that the storage of landlocked salmon eggs and sperm reduces the viability of offspring, so the storage time of gametes should be minimized if possible.

SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO	1
2	AINEISTO JA MENETELMÄT	3
2.1	Aineisto	3
2.2	Menetelmät	5
2.3	Aineiston tilastollinen käsittely	8
3	TULOKSET	9
3.1	Jälkeläisten elinkyky.....	9
3.2	Ovaarionesteen pH:n ja siittiöiden liikkuvuuden säilytyksen aikaiset muutokset	11
4	TULOSTEN TARKASTELU JA PÄÄTELMÄT	14
	KIITOKSET	18
	KIRJALLISUUSLUETTELO	19
	LIITE 1. PERHEKOHTAISET ELINKYKYPROSENTIT	25

1 JOHDANTO

Yhä useampi luonnossa elävä kalalaji ja -kanta kärsii elinympäristönsä olosuhteissa tapahtuvista muutoksista. Kalakantojen taantumiseen ja uhanalaisuuteen ovat vaikuttaneet erityisesti ilmastonmuutos, vesistöjen rehevöityminen ja saastuminen, liikakalastus sekä kalojen suunnittelematon istutustoiminta, joka on johtanut usein kalakantojen sekoittumiseen ja mahdollisesti paikallisten sopeumien heikkenemiseen (Parrish ym. 1998, Makkonen ym. 2000, Aho ym. 2002). Vesistö rakentamisesta on aiheutunut eniten haittaa vaelluskaloille, kuten lohelle, taimenelle, siialle, ankeriaalle ja nahkiaiselle (Marttila ym. 2014). Yksittäisistä tekijöistä jokien patoaminen ilman kalojen ohinsumahdollisuutta on ollut monissa joissa suurin syy lohikalakantojen katoamiseen (MacGrimmon ja Gots 1979). Virtakutuiset vaelluskalat ovat kärsineet myös kutukoskien uittoperkauksista, joiden seurauksena vaelluskaloille tärkeiden kutu- ja poikastuotantoalueiden määrä on vähentynyt (Huusko ym. 2021).

Säilytysviljelyohjelmien tarkoituksena on tuottaa kaloja luonnonvaraisten kantojen täydentämiseksi, ylläpitää uhanalaisten lajien ja populaatioiden geneettistä monimuotoisuutta sekä ehkäistä niiden välitöntä häviämistä (Fraser 2008, Fisch ym. 2015). Merkittävin haaste kalojen viljelynvaraisessa säilytyksessä on toimia siten, että laitoksissa olevat lajit ja kannat säilyvät elinkelpoisina ja edustavat mahdollisimman hyvin luonnossa vielä tavattavaa monimuotoisuutta (Makkonen ym. 2000). Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että kalalajien ja -kantojen laitosviljelyyn on tärkeää saada geneettisesti mahdollisimman edustavat emoparvet ensisijaisesti täydellisen (vaelluskaloilla joessa syntyneet) tai osittaisen (joki-istukkaat) luonnonkierron läpikäyneistä yksilöistä. Teoriassa emoparveen voidaan saada korkeintaan sama määrä perinnöllistä muuntelua kuin mitä perustajayksilöissä on olemassa (Aho ym. 2002). Myös sillä, miten perustamishedelmöitykset tehdään, voidaan vaikuttaa tulevan emoparven geneettiseen monimuotoisuuteen (Aho ym. 2002). Kontrolloidut sukupuuhedelmöitykset ovat geneettisesti tehokkain tapa lisätä tehollista populaatiokokoa (kannan perinnölliseen monimuotoisuuteen vaikuttavien lisääntyvien yksilöiden laskennallinen määrä) emoparven kokoa kasvattamatta. Luonnosta saatavien emokalojen keskinäisiä sukulaisuuksia ei kuitenkaan voida tietää ennalta, jolloin perinnöllisen monimuotoisuuden säilymisen kannalta tehokkaimpia hedelmöitysmalleja ovat ns. faktoriaaliset paritustavat (matriisit). Hedelmöitysten jälkeen viljelyssä voidaan ainoastaan ylläpitää talteen saatua muuntelua ja minimoida haitallisia perinnöllisiä vaikutuksia (Piironen 1995), kuten sukusiitosta ja laitosympäristöön liittyvää tahallista tai tahatonta valintaa.

Saimaan järvilohen (*Salmo salar* m. *sebago*) säilyminen Suomen eläimistöissä alkuperäisenä ja geneettisesti sekoittumattomana kantanaan on ollut Pielisjoen Kuurnan voimalaitoksen rakentamisesta (1971) lähtien täysin vesiviljelyn ja istutusten varassa (Kaijomaa ym. 2003). Jo tätä ennen järvilohikanta oli taantunut

voimakkaasti lisääntymisalueiden tuhoutumisen, Pielisjokeen aikaisemmin rakennettujen Pamilon (1955) ja Kaltimon (1958) voimalaitosten sekä liikkakalastuksen seurauksena. Järvilohen kutualueet tuhoutuivat 1950-70 - luvuilla tapahtuneen voimalaitosrakentamisen myötä myös Lieksanjoella (Vuorinen 1982, Valkonen ja Laakkonen 2015). Nykyään Saimaan (Vuoksen vesistöalueen) järvilohi luokitellaan äärimmäisen uhanalaiseksi (Hutchings ym. 2019, Hyvärinen ym. 2019).

Luonnonvarakeskuksen (Luke) Enonkosken kalanviljelylaitoksella säilytetään Saimaan järvilohen emokalastoa. Jo vuodesta 1983 lähtien on uusi laitosemovuosiluokka perustettu vuosittain Pielisjoesta (vähemmässä määrin myös Lieksanjoesta) pyydettyjen emokalojen sukutuotteista. Peräkkäisten vuosiluokkien avulla saadaan käyttöön laajempi geenipooli, ja hedelmöittäessä parvia ristiin parannetaan jälkeläisten monimuotoisuutta yhden parven käyttöön verrattuna (Aho ym. 2002). Emoparvien geneettisen monimuotoisuuden säilymisen turvaamiseksi järvilohen emoparvihedelmöitykset tehdään mahdollisimman suurella perustajayksilömäärällä ja useita hedelmöityseriä (täys- ja puolisisarperheitä) tuottaen. Vuosittaisen emokalapyynnin tavoitteena on ollut saada luonnosta vähintään 50 kutuparia (Kaijomaa ym. 2011), mikä on tosin saavutettu vain muutamana vuotena koko pyyntihistorian aikana.

Hedelmöityksissä käytetään faktoriaalista paritustapaa. Perustajayksilöiden määrästä riippuen se voidaan tehdä ns. täysmatriisihedelmöityksenä, jossa kunkin naaraan mäti jaetaan yhtä moneen osaan kuin koiraita on käytettävissä, ja sitten jokainen erä hedelmöitetään eri koiraalla (Aho ym. 2002). Vaihtoehtoisesti voidaan tuottaa useita pienempiä hedelmöitysmatriiseja, joissa käytetään eri emokalayksilöitä. Tällöin tulevaan emoparveen ei kuitenkaan saada mukaan kaikkia mahdollisia perheyhdistelmiä. Perheet haudotaan omissa haudontayksiköissään silmäpisteasteelle asti (lämpötilan päiväastesumma haudonnassa n. 300 °C), jonka jälkeen mätimäärä tasataan hedelmöityserittäin eli jokaisesta perheestä otetaan sama määrä mätimunia tulevan emoparven jatkokasvatusvaiheeseen. Luonnosta pyydettyjä kutukaloja saadaan kuitenkin usein pitkällä aikavälillä, johtuen kalojen eriaikaisesta kutunoususta ja mädin ja maidin eriaikaisesta kypsymisestä. Tämän vuoksi sukutuotteita joudutaan säilyttämään jopa muutamia viikkoja ennen mädin hedelmöitystä. Aiempien tutkimusten perusteella voidaan olettaa pitkien säilytysaikojen heikentävän sukutuotteiden laatua ja vaikuttavan siten negatiivisesti myös hedelmöitystulokseen ja alkuiden varhaiskehitykseen. Tällöin on mahdollista, että joidenkin emojen jälkeläiset menetetään kokonaan ja siten emokalaston geneettisen monimuotoisuuden säilyminen heikentyy.

Emokalan ovulaation jälkeisen ruumiinontelossa olevan mädin ylikypsymisen heikentävästä vaikutuksesta mädin laatuun ja kuoriutuvien poikasten elinkelpoisuuteen löytyy useita aikaisemmin tehtyjä tutkimuksia (mm. Rime ym. 2004, Aegerter ym. 2004, 2005, Mansour ym. 2008, Bahrekazemi ym. 2009, Bizuayehu ym. 2019, Samarin ym. 2019). Ylikypsymisen aikana mätimunien ja ovaarionesteen sisällä tapahtuu morfologisia, fysiologisia, biokemiallisia, histologisia, solu- ja molekyyli muutoksia, jotka ovat osittain

samanlaisia kuin lypsetyn mädin säilytyksen aikana havaitut muutokset (Samarin ym. 2015). Lypsetyn mädin säilytysajan vaikutusta jälkeläisten elinkelpoisuuteen on tutkittu mm. kirjolohella (*Oncorhynchus mykiss*) (Komrakova ja Holtz 2009, Bahabadi ym. 2011). Sukusolujen aineenvaihdunta ja fysiologiset ominaisuudet ovat kuitenkin kalalajikohtaisia ja riippuvat säilytysolosuhteista (Inanan 2020), joten on tärkeää saada lajikohtaista tietoa niistä myös äärimmäisen uhanalaisen Saimaan järvilohen osalta. Useissa aikaisemmissa tutkimuksissa sekä mädin ovaarionesteen että maidin pH-arvon on todettu laskevan säilytyksen aikana (mm. Komrakova ja Holtz 2009, Viveiros ym. 2010, Bahabadi ym. 2011, Samarin ym. 2015). Esimerkiksi Atlantin lohella (*Salmo salar*) tehdyn tutkimuksen mukaan mädin ovaarionesteen pH laski ovulaation jälkeen, ja kaksi viikkoa siitä lypsetyn mädin hedelmöityssaste ja alkioiden eloonjääminen väheni merkittävästi. Myös kuoriutuneiden poikasten selviytymisaste heikkeni ja epämuodostumat lisääntyivät merkittävästi (Mommens ym. 2015).

Tutkimukseni tarkoituksena oli selvittää vähentääkö järvilohen mädin ja maidin säilytysaika jälkeläisten varhaista elinkelpoisuutta sekä esiintyykö jälkeläisten elinkyvyssä vanhemmista johtuvaa vaihtelua. Oletuksena oli, että jälkeläisten selviytymisessä olisi suuria eroja perheiden välillä riippuen etenkin naaraasta. Elinkelpoisuudessa esiintyvät erot perheiden välillä voivat johtua vanhempien perinnöllisistä ominaisuuksista, mutta myös naaraasta aiheutuvilla ns. maternaalisilla tekijöillä voi olla tähän vaikutusta (Nagler ym. 2000, Eskelinen ym. 2002). Oletuksena myös oli, että mädin ovaarionesteen pH-arvo alenee ja siittiöiden liikkuvuus laskee sukutuotteiden säilytyksen aikana, mikä korreloisi jälkeläisten elinkyvyn kanssa.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Aineisto

Pielisjoen Kuurnan vesivoimalaitoksen alapuolelta pyydettiin verkoilla 18.9–14.10.2019 välisenä aikana kudulle nousevia järvilohiemoja, jotka säilytettiin pyyntipaikalla sijaitsevissa altaissa siihen asti, kunnes ne olivat valmiita lypsettäviksi. Kalojen kutuvalmius tarkastettiin kerran viikossa ja kokeessa käytettiin naaraita, joiden ovulaatio oli juuri alkanut ja koiraita, joiden maiti oli juoksevaa. Koetta varten lypsettiin 14.10.2020 mäti kymmeneltä naaraalta ja maitia kymmeneltä koiraalta (taulukko 1).

Taulukko 1. Pielisjoesta (18.9–14.10.2019) pyydettyjen järvilohinaaraiden ja -koiraiden (*Salmo salar* m. *sebago*) yksilötiedot. Emokoodilla A1–A10 emokalot käytetty A-matriisin hedelmöityksissä ja emokoodilla B1–B10 emokalot B-matriisin hedelmöityksissä.

Emokoodi ja sukupuoli	Paino (g)	Pituus (mm)	Mädin paino (g)*	Mätimunnan keskipaino (g)**	Mätimäärä (kpl)***
A1 ♀	4350	737	798	0,133	6000
A2 ♀	4960	755	808	0,115	7026
A3 ♀	4125	721	875	0,128	6836
A4 ♀	4140	710	706	0,133	5308
A5 ♀	2440	635	521	0,117	4453
A6 ♂	3760	745	-	-	-
A7 ♂	3880	735	-	-	-
A8 ♂	5810	915	-	-	-
A9 ♂	3620	725	-	-	-
A10 ♂	5080	840	-	-	-
B1 ♀	3040	715	746	0,128	5828
B2 ♀	3590	745	664	0,117	5675
B3 ♀	5110	825	1083	0,133	8143
B4 ♀	4300	785	800	0,126	6349
B5 ♀	3710	705	663	0,125	5304
B6 ♂	2350	695	-	-	-
B7 ♂	4990	855	-	-	-
B8 ♂	4220	765	-	-	-
B9 ♂	3670	755	-	-	-
B10 ♂	4120	745	-	-	-

*Mädin paino punnittu ilman ovaarionestettä.

**Mätimunnan keskipaino laskettu punnitsemalla 50:n mätimunnan yhteispaino (ilman ovaarionestettä), josta laskettu keskiarvona yhden mätimunnan paino.

***Lypsetyn mädin kappalemäärä laskettiin jakamalla mädin paino mätimunnan keskipainolla.

Mäti lypsettiin kannellisiin muoviasiastioihin (2,5 l Orthex™) ja maiti suljettaviin salpapusseihin (½ l Minigrip™), joihin lisättiin 100-prosenttista happea. Ennen maidin lypsyä emokalojen vatsapuoli kuivattiin ja koiraan virtsarakko tyhjennettiin puristamalla, jolla ehkäistiin maidin kontaminaatio ja aktivoituminen. Mätiastiat ja salpapusset laitettiin säilytykseen jäiden päälle styrox-laatikoihin ja kuljetettiin Luonnonvarakeskuksen Enonkosken kalanviljelylaitoksen karanteeniosastoon, jossa suoritettiin mädin hedelmöitykset ja haudonta jäljempänä kuvatulla tavalla. Emokalojen yksilötiedot (ruumiinpituus ja -paino, lypsetyn mädin kokonaispaino ja yksittäisen mätimunnan keskipaino) kirjattiin ylös ja kaloilta leikattiin näytepala evästä mahdollista DNA-analyysia varten. Lypsetyt kalat vapautettiin takaisin Pielisjokeen.

2.2 Menetelmät

Ensimmäiset mädin hedelmöitykset tehtiin mädin ja maidin talteenottopäivänä 14.10.2020, jolloin muodostettiin kaksi 5 x 5-hedelmöitysmatriisia (matriisi A ja matriisi B). A- ja B-matriiseissa käytettiin eri emokaloja (taulukko 2). Emokalojen paritukset suoritettiin ns. täysfaktoriaalisella hedelmöitysmallilla (hedelmöitysmatriiseina) ja jokainen yhdistelmä (täyssisarperhe) haudottiin erillisissä haudontayksiköissä. Näin aineistosta voitiin arvioida myös vanhempien suhteellisia vaikutuksia jälkeläisten varhaiseen elinkykyyn, käsittäen sekä naaraan ja koiraan itsenäiset vaikutukset että vanhempien keskinäisestä vuorovaikutuksesta johtuvan vaihtelun. Matriiseista tehtiin kolme samanlaista toistohedelmöitystä kullekin 50 perheelle. Perhekohtainen mätimäärä tasattiin punnitsemalla kokeen alussa kunkin naaraan mädistä 50 mätimunaa siten, että mädin ovaarioneste poistettiin lävikköä apuna käyttäen. Tämän jälkeen 50 kappaleen mätimäärä/perhe punnittiin perhekohtaisesti muovipurkkeihin, joissa mädit hedelmöitettiin. Purkit/perheet järjestettiin matriisimuotoon, jossa riveinä olivat naaraat ja sarakkeina koiraat. Perheet hedelmöitettiin yksitellen pipetoimalla 10 µl maitia/perhe, jonka jälkeen purkkeihin lisättiin välittömästi vesi hedelmöittymistä varten. Veden lisäyksen jälkeen purkkeja liikuteltiin kevyesti hedelmöityksen varmistamiseksi. Kukin hedelmöitetty perhe laitettiin haudontaan omaan haudontayksikkönsä. Haudontayksikköinä toimivat haudontakaukaloihin sijoitetut haudonta-asetit, jotka oli jaettu tasakokoisiin lokerikkoihin. Yhden lokeron pohjan pinta-ala oli 12 x 5 cm, ja siinä oli tasavälein suorakaiteenmuotoiset 2 x 20 mm aukot (kuva 1). Perheiden sijoitus haudonta-asettimien lokerikkoihin satunnaistettiin hedelmöityseräkohtaisesti. Jäljelle jääneitä mätejä ja maiteja säilytettiin styrox-laatikoissa jäiden päällä (säilytyslämpötila 1 °C) ja hedelmöitysmatriisit toistettiin kaksi kertaa viikon välein edellä kuvatulla tavalla (yhteensä kolme hedelmöityserää kolmena ajankohtana: 14.10., 21.10. ja 28.10.). Perhekasvatusyksiköitä tuli yhteensä 3 x 150 kpl. Säilytyksen aikana, kolmen päivän välein, lisättiin salpapusseihin maideille happea sekä kevyesti heilutettiin mätiastioita, jolla ehkäistiin pinnalla olevien mätimunien mahdollista kuivumista.



Kuva 1. Haudontalokerikot (pohjan pinta-ala 12 x 5 cm, reiän koko 2 x 20 mm).

Taulukko 2. Järvilohiperheiden hedelmöitysmatriisit (A-matriisissa naaraat A1–A5 ja koiraat A6–A10, B-matriisissa naaraat B1–B5 ja koiraat B6–B10). Jokaisen naaraan mädistä muodostettiin viisi perhettä, jotka hedelmöitettiin eri koirilla (50 mätimunaa/perhe). Kaikista perheistä tehtiin kolme toistoa. Hedelmöitykset toistettiin kolmena ajankohtana, viikon välein: 14.10., 21.10. ja 28.10. Perheiden kokonaismääräksi tuli 450 kpl (3 x 150 kpl).

A Hedelmöitys 14.10.2019						B Hedelmöitys 14.10.2019					
♂						♂					
♀	A6	A7	A8	A9	A10	♀	B6	B7	B8	B9	B10
A1	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50	B1	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50
A2	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50	B2	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50
A3	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50	B3	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50
A4	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50	B4	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50
A5	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50	B5	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50

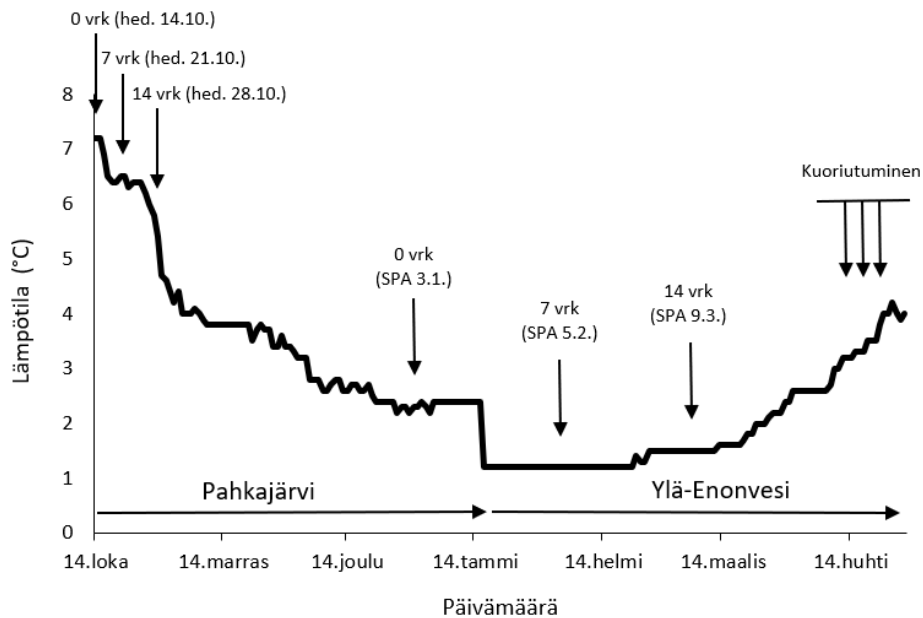
A Hedelmöitys 21.10.2019						B Hedelmöitys 21.10.2019					
♂						♂					
♀	A6	A7	A8	A9	A10	♀	B6	B7	B8	B9	B10
A1	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50	B1	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50
A2	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50	B2	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50
A3	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50	B3	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50
A4	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50	B4	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50
A5	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50	B5	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50

A Hedelmöitys 28.10.2019						B Hedelmöitys 28.10.2019					
♂						♂					
♀	A6	A7	A8	A9	A10	♀	B6	B7	B8	B9	B10
A1	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50	B1	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50
A2	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50	B2	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50
A3	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50	B3	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50
A4	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50	B4	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50
A5	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50	B5	3x50	3x50	3x50	3x50	3x50

Kunkin naaraan ovaarionesteen pH-arvo mitattiin mädin säilytysastiasta kokeen alussa sekä viikon välein hedelmöityshetkillä kalibroitua laboratorio pH-mittaria käyttäen (PHM220, MeterLab™, Radiometer, Kööpenhamina). Vastaavina ajankohtina tehtiin kunkin koiraan maidille aktivointitestit Itä-Suomen yliopiston ympäristö- ja biotieteiden laitoksella. Siittiöiden liikkuvuus mitattiin käyttämällä tietokoneavusteista siittiöiden liikkuvuusanalyysia; CASA (integroituu siemennesteanalyysijärjestelmä, ISAS v1: Proiser, Valencia, Espanja), jossa oli mustavalkoinen CCD-kamera (kuvausnopeus 60 kuvaa/s) ja negatiivinen vaihekontrastimikroskoopi (100-kertainen suurennus). CASA mahdollistaa objektiivisen arvioinnin siittiön soluominaisuuksista, kuten liikkeen nopeudesta ja kestosta, mahdollistaen yksinkertaisen ja nopean kvantitatiivisen arvioinnin kalan siemennesteen laadusta sekä sen kyvystä hedelmöittää mätää (Kime ym. 2001, Verstegen ym. 2002). Siittiöiden liikkuvuusanalyysit suoritettiin näytteiden 5 sekunnin ravistelun jälkeen lisäämällä 0,1 µl maitia mikroskoopin objektilasille (Leja, Nieuw-Vennep, Alankomaat; Leja 2-kammion korkeus 20 µm) ja aktivoimalla siittiöt 3 µl ovaarioneste:vesi -seoksessa (1:1 suhteessa). Matriisien sisällä kaikkien viiden

koiraan siittiöt aktivoitiin erikseen kunkin parituksissa käytetyn viiden naaraan ovaarionesteessä. Siittiöiden liikkuvuusmittaukset sisälsivät kolme riippumatonta toistoa kussakin koiras-naarasyhdistelmässä (kaikissa kolmessa aikapisteessä). Kaikki mittaukset tehtiin 10 sekunnin jälkeen maidin aktivoinnista. Siittiöiden liikkuvuusparametreista mitattiin liikkumattomien siittiöiden osuudet ja siittiöiden käyräviivaiset uintinopeudet (VCL=curvilinear velocity) eli pisteestä pisteeseen mitattujen siittiöiden todellisten uintimatkojen mukaan lasketut keskimääräiset nopeudet.

Mädin kuolleisuutta seurattiin haudonnan ajan perhekohtaisesti mädin silmäpisteasteelle asti (lämpötilan päiväastesumma haudonnassa n. 300 °C) (kuva 2), jolloin alkioiden silmät erottuivat selvästi mätimunasta. Kuolleisuuden seuraamista jatkettiin aina poikasten kuoriutumiseen saakka. Kuolleet mätimunat ja kuolleet poikaset laskettiin ja poistettiin haudontalokeroista 1-2 kertaa kuukaudessa. Vastakuoriutuneista poikasista määritettiin epämuodostuneiden (epänormaali alkionkehitys, selkärankavika, kahdella tai useammalla yksilöllä yhteisiä ruumiinosia) yksilöiden osuus. Vaikka haudontatulokset (elävät, terveet alkioit/poikaset) määritettiin eri ajankohtina (silmapistevaihe, kuoriutuminen, kuoriutumisen jälkeinen ruskuaispussivaihe), analysoitiin ajankohtien haudontatulosten korkean korrelaation vuoksi tilastollisesti vain ns. elinkyky, joka kattoi kuoriutumisen jälkeisen eloonjäännin vähennettynä elinkelvottomat, epämuodostuneet yksilöt, jotka laskettiin mukaan kuolleisiin.



Kuva 2. Järvilohiperheiden haudontaveden lämpötila kokeen aikana (vesitys: Pahkajärvi/Ylä-Enonvesi). Sukutuotteiden eri säilytyserien (0 vrk, 7 vrk ja 14 vrk) hedelmöityspäivämäärät sekä silmäpisteastevaiheiden (SPA) päivämäärät, jolloin elävien mätimunien osuudet laskettiin.

2.3 Aineiston tilastollinen käsittely

Aineiston tilastolliset analyysit suoritettiin SAS 9.4. -tilasto-ohjelmalla (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) käyttämällä lineaarisia sekamalleja (MIXED-proseduuri). Mallit ajettiin restricted maximum likelihood (REML)-estimointimenetelmää käyttäen. Ensimmäiseksi testattiin, erosivatko normaalisti kehittyneiden vastakuoriutuneiden poikasten osuudet (elinkyky) järvilohiperheissä sukutuotteiden erilaisten säilytysaikojen suhteen. Tässä havaintoyksikkönä käytettiin yksilöllisiä haudontalokeroita ($n = 450$). Vaihtoehtoisia, eri määrän varianssiparametreja sisältäviä malleja kokeiltiin, ja niitä karsittiin ensisijaisesti mallin konvergoitumisen ja parametrien estimoituvuuden perusteella. Vastemuuttujana käytetylle elinkyvylle tehtiin arcsin-neliöjuurimuunnos, jolla sen normaalisuutta parannettiin. Lopullisessa mallissa säilytysaika (hedelmöityshetkeä 1-3) käytettiin kiinteänä tekijänä, jonka lisäksi naarasvaikutus, aika x perhe (naaras x koiras) -yhdyksivaikutus sekä haudontakaukalo otettiin malliin mukaan satunnaisina tekijöinä. Täydellistä mallia, jossa olisi mukana sekä naaraan ja koiraan itsenäiset vaikutukset sekä kaikki kaksin- ja kolminkertaiset yhdysvaikutukset (myös ajan suhteen) ei voitu tehdä estimoitumisongelmien takia. Koirasvaikutuksen varianssi oli mitättömän pieni, eikä siksi tullut estimoiduksi. Lisäksi yhdysvaikutustermit aika x naaras ja aika x perhe sekoittuivat keskenään, jolloin ensiksi mainittu käsitti suuren osan toisen termin varianssista; so. tekijöiden ollessa mukana samassa mallissa jälkimmäisen termin varianssi laski ja siitä tuli ei-merkitsevä, vaikka yksittäisinä tekijöinä (toisen puuttuessa) molemmat olivat erittäin merkitseviä. Tämän vuoksi lopullisessa mallissa huomioitiin vain jälkimmäinen, ajan ja naaras-koiras-yhdistelmän (eli täyssisarperheen) yhdysvaikutus.

Jälkeläisten elinkyvyn lisäksi testattiin toistettujen mittausten lineaarisella sekamallilla säilytysajan (kiinteä tekijä) ja naaraan (satunnaistekijä) vaikutusta vasteena olleen ovaarionesteen pH:n muutokseen. Mallissa jäännösvaihtelun rakenne määritettiin siten, että pH:n oletettiin laskevan kunkin naaraan ovaarionesteessä ajan suhteen ja perättäisissä mittauksissa jäännökset olivat toisiinsa nähden korreloituneita (kovarianssirakenteena ARH(1) (Heterogeneous First-Order Autoregressive)).

Maidin CASA-aineistosta testattiin, erosivatko liikkumattomien siittiöiden osuus ja siittiöiden käyräviivainen uintinopeus (VCL) maidin erilaisten säilytysaikojen suhteen. Molempien liikkuvuusominaisuuksien osalta mallin vastemuuttujana käytettiin kolmen toistomittauksen keskiarvoa ($n=50$ naaras-koirasyhdistelmää x 3 toistoa x 3 säilytysaika = 450 havaintoarvoa ominaisuutta kohti). Säilytysaika käytettiin kiinteänä tekijänä (hedelmöityshetket 1-3). Satunnaistekijöinä mallissa huomioitiin hedelmöitysmatriisien välinen vaihtelu, koirasvaikutus, naarasvaikutus (siittiöiden aktivoinnit eri naaraiden ovaarioneste:vesi -seoksella), naaras x koiras -yhdistelmä (tätä parametria ei voitu estimoida liikkumattomien siittiöiden prosentiosuudelle liian pienen varianssin takia) sekä aika x koiras-, aika x naaras- ja aika x naaras x koiras-vaikutukset. Parittaisia eroja säilytysaikojen välillä verrattiin käyttämällä Tukey-Kramerin korjausta.

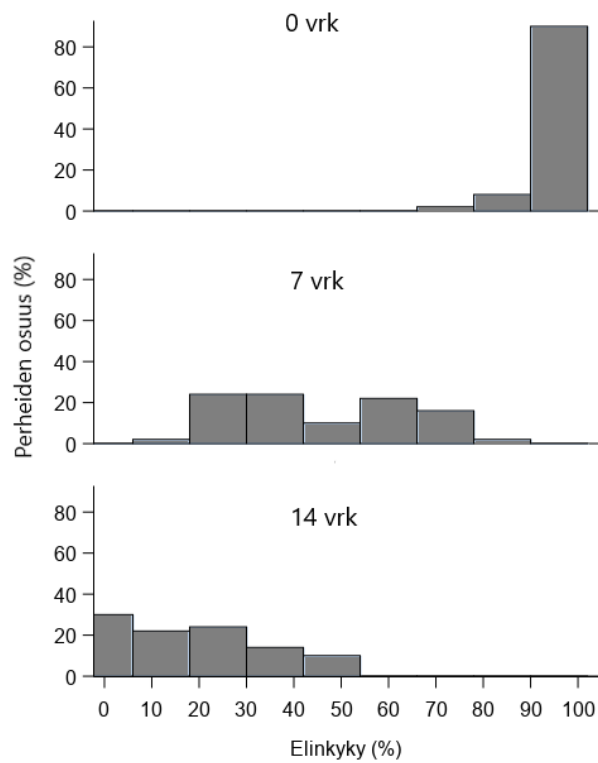
Satunnaistekijöiden merkitsevyydet malleissa testattiin likelihood ratio -testillä, missä karsitun ja täyden mallin sovitteita vertailtiin niiden -2LL-arvojen erotuksella pudottamalla kukin testattava tekijä kerrallaan mallista (Morrell 1998). Kullekin yksittäiselle varianssikomponentille χ^2 -testisuureta noudattavan asymptoottisen jakauman p-arvo kerrottiin 0,5:llä, koska todennäköisyysuhteiden määräämän asymptoottisen jakauman (pakotettu olemaan positiivinen) tulisi olla 50:50-sekoitus $\chi^2(0)$ - ja $\chi^2(1)$ jakaumia yksittäiselle varianssikomponentille (Self ja Liang 1987). Kaikkiin analyysihin käytettiin merkitsevyytensä 0,05.

3 TULOKSET

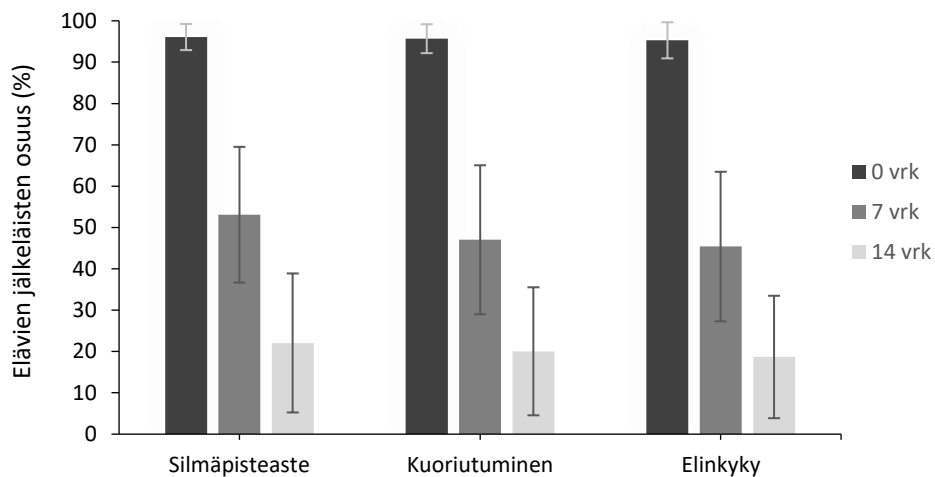
3.1 Jälkeläisten elinkyky

Järvilohen sukutuotteiden pidemmällä säilytysajalla oli selvä poikasten selviytymistä heikentävä vaikutus ($F_{2, 2,83} = 185,87$, $p = 0,001$; kuva 3). Vaikka tilastollinen testaus tehtiin vain kuoriutumisen jälkeiselle elinkyvyille (normaalisti kehittyneiden vastakuoriutuneiden poikasten osuudet), säilytysajan vaikutus oli selkeästi nähtävissä jo aiemmin mädin silmäpistevaiheessa (kuva 4). Epämuodostuneiden poikasten osuus kuoriutuneissa poikasissa oli välittömästi hedelmöityksen jälkeen haudontaan laitetuilla, 0 vrk:n säilytysajan mädeillä 0,4 % ($\pm 0,9$ SD), 7 vrk:n mädeillä 3,5 % ($\pm 1,2$) ja 14 vrk:n mädeillä 6,9 % ($\pm 1,2$). Normaalisti kehittyneiden kuoriutuneiden poikasten osuus (=elinkyky) kaikista hedelmöitetystä mädeistä oli 0 vrk:n ryhmässä keskimäärin 95,3 % ($\pm 4,4$ SD), 7 vrk:n ryhmässä 45,4 % ($\pm 18,1$) ja 14 vrk:n ryhmässä 18,7 % ($\pm 14,8$) (liite 1). Elinkyvyn heikkeneminen korostui osalla naaraista ensimmäisen säilytysviikon aikana ja toisilla toisen säilytysviikon aikana (kuva 5). Poikkeuksellisesti yhden naaraan (B1) neljässä puolisisarperheessä elinkykyisten alkioiden keskimääräinen osuus oli 14 vrk:n ryhmässä korkeampi kuin 7 vrk:n ryhmässä (kuva 5).

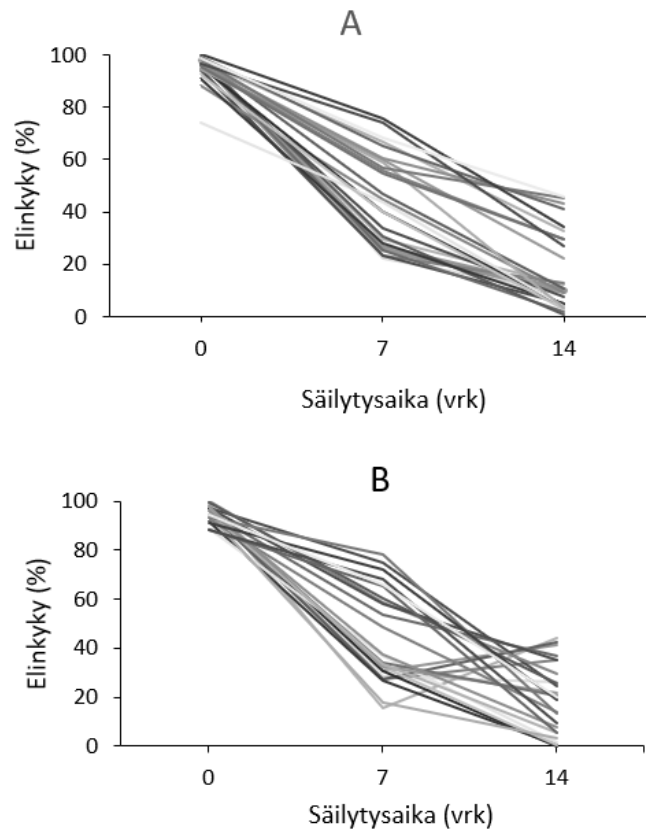
Elinkyvyyssä oli selvää vaihtelua eri naaraiden välillä (Var = $0,016 \pm 0,008$ SE; $\chi^2 = 62,1$, $df = 1$, $p < 0,001$), kun taas koiraiden vaikutus oli merkityksetön (varianssi oli lähellä nollaa eikä siksi estimoitu). Lisäksi ajan ja naaras \times koiras-kombinaation välillä oli merkitsevä yhdysvaikutus (Var = $0,012 \pm 0,002$ SE; $\chi^2 = 60,1$, $df = 1$, $p < 0,001$), mikä johtuu siitä, että elinkyvyn heikkeneminen vaihteli säilytysajan myötä sekä naaraiden välisissä että naaraiden sisäisissä puolisisarperheissä (kuva 5). Haudontakaukalolla ei ollut vaikutusta alkioiden elinkykyyn (Var = $0,000 \pm 0,000$ SE; $\chi^2 = 0,2$, $df = 1$, $p = 0,327$).



Kuva 3. Frekvenssijakaumat järvilohiperheiden ($n = 50$) terveinä kuoriutuneiden poikasten keskimääräisille prosenttiosuuksille (=elinkyky-%) kaikista hedelmöitetystä mädeistä sukutuotteiden eri säilytysaikoina (0 vrk, 7 vrk ja 14 vrk).



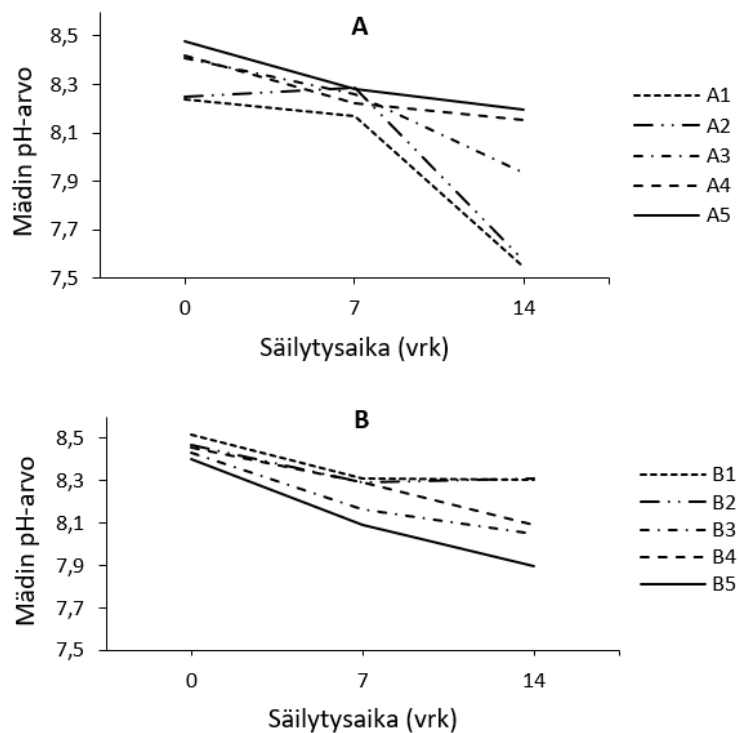
Kuva 4. Elävien jälkeläisten osuus ($ka\% \pm SD$) mädin silmäpisteasteella ja poikasten kuoriutumisessa sekä kuoriutuneiden terveiden poikasten prosentuaalinen osuus (=elinkyky-%) kaikista hedelmöitetystä mädeistä sukutuotteiden eri säilytysaikojen (0 vrk, 7 vrk ja 14 vrk) suhteen ($n = 50$ perhettä).



Kuva 5. A- ja B-matriisiperheiden ($n_A = 25$, $n_B = 25$) keskimääräisen elinkyky-% (=elävistä poikasista vähennetty epämuodostuneet poikaset) sukutuotteiden eri säilytysaikojen (0 vrk, 7 vrk ja 14 vrk) suhteen.

3.2 Ovaarionesteen pH:n ja siittiöiden liikkuvuuden säilytyksen aikaiset muutokset

Kaikkien naaraiden ($n = 10$) mädin ovaarionesteen pH-arvo laski kahden viikon säilytyksen aikana ($F_{2, 7,92} = 59,64$, $p < 0,001$) (kuva 6). Keskimääräinen pH-arvo oli säilytyksen alussa $8,40 (\pm 0,03 \text{ SE})$, 7 vrk:n jälkeen $8,24 (\pm 0,02 \text{ SE})$ ja 14 vrk:n jälkeen $8,01 (\pm 0,08 \text{ SE})$. Parittaisessa vertailussa ensimmäisen (0 vrk) ja kolmannen (14 vrk) mittauskerran pH-arvot erosivat erittäin merkittävästi (Tukey-Kramer, $p < 0,001$). Ensimmäisen säilytysviikon aikana pH laski eniten ($p = 0,007$), jonka jälkeen lasku tasoittui toisella säilytysviikolla ($p = 0,075$). Myös naaraiden välillä oli eroja pH:n vaihtelussa ja laskussa (Var $0,005 \pm 0,002$; $\chi^2 = 7,5$, $df = 1$, $p = 0,003$) (kuva 6).



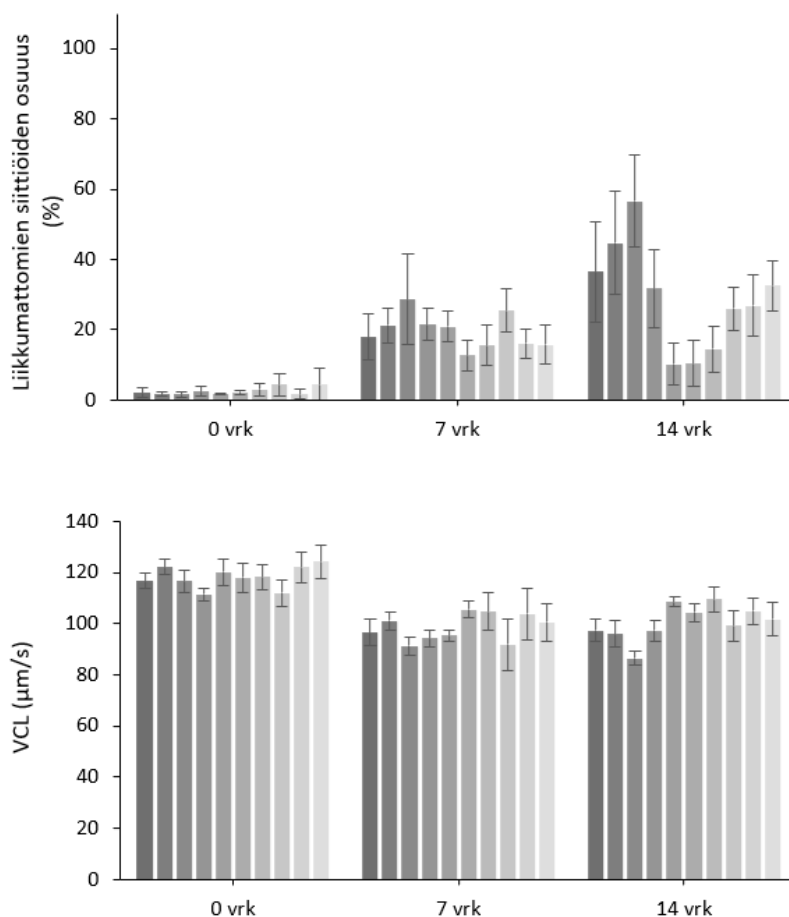
Kuva 6. Järvilohinaaraiden (A-matriisin naaraat: A1-A5 ja B-matriisin naaraat: B1-B5) ovaarionesteen pH-arvojen muutos maidin säilytysajan (0 vrk, 7 vrk ja 14 vrk) suhteen.

Kymmenen sekuntia maidin aktivoinnin jälkeen mitattu liikkumattomien siittiöiden osuus lisääntyi säilytyksen aikana erittäin merkitsevästi ($F_{2,19,2} = 25,98$, $p < 0,001$). Liikkumattomien siittiöiden mallikorjattu osuus 0 vrk:n säilytyksessä oli keskimäärin 2,5 % ($\pm 3,7$ SE), 7 vrk:n säilytyksessä 19,7 % ($\pm 3,7$) ja 14 vrk:n säilytyksessä 28,9 % ($\pm 3,7$) (kuva 7). Liikkumattomien siittiöiden keskimääräinen prosenttiosuus ensimmäisellä näytteenottokerralla poikkesi toisen (Tukey-Kramer, $p = 0,001$) ja kolmannen kerran ($p < 0,001$) prosenttiosuuksista, kun taas toisen ja kolmannen näytteenottoajan välinen ero ei ollut merkitsevä ($p = 0,056$). Myös siittiöiden uintinopeus (VCL) heikkeni säilytyksen aikana erittäin merkitsevästi ($F_{2,23,5} = 59,94$, $p < 0,001$). Keskimääräinen uintinopeus oli merkitsevästi korkeampi ensimmäisellä näytteenottokerralla ($117,9 \pm 2,6 \mu\text{m/s}$) verrattuna myöhempään ajankohtiin ($p < 0,001$). Eroa ei kuitenkaan enää havaittu toisen ($98,4 \pm 2,6$) ja kolmannen näytteenottokerran välillä ($100,5 \pm 2,6$) ($p = 0,556$). Sekä koiraiden että naaraiden välisen vaihtelun havaittiin vaikuttavan VCL-arvoihin, mutta ei liikkumattomien siittiöiden prosenttiosuuteen (taulukko 3). Molemmassa siittiöiden liikkuvuusominaisuuksissa (liikkumattomien siittiöiden osuus ja VCL) ajallinen muutos osoitti kuitenkin erittäin merkittävää vaihtelua koiraiden välillä (taulukko 3, kuva 7). VCL-arvojen osalta myös vaihtelua naaraiden ja koiras-naarasyhdistelmien (maiti - ovaarioneste) välillä erosivat säilytysajan suhteen.

Taulukko 3. Varianssiparametrien estimaatit (\pm SE) ja niitä vastaavat merkitsevyystatot liikkumattomien siittiöiden prosenttiosuudelle ja siittiöiden käyräviivaiselle uintinopeudelle (VCL, $\mu\text{m/s}$) mitattuna kolmella näytteenotto-kerralla sukusolujen keräämisen jälkeen (0 vrk, 7 vrk ja 14 vrk).

Varianssiparametri	Liikkumattomat siittiöt (%)	<i>p</i> -arvo	VCL	<i>p</i> -arvo
Hedelmöitysmatriisi	10,721 (25,038)	0,219	6,073 (16,321)	0,292
Koiras (K)	9,115 (17,224)	0,264	12,010 (8,661)	0,016
Naaras (N)	1,977 (3,243)	0,240	8,453 (5,535)	0,005
Koiras \times Naaras *	-	-	0,233 (1,525)	0,500
Aika \times Koiras	57,633 (22,263)	<0,001	11,912 (5,059)	<0,001
Aika \times Naaras	3,434 (4,475)	0,171	4,379 (2,594)	0,004
Aika \times Koiras \times Naaras	4,635 (6,855)	0,240	6,694 (2,634)	<0,001
Jäännös	107,480 (8,966)		22,260 (1,857)	

*Liikkumattomien siittiöiden prosenttiosuudelle ei voitu estimoida koiras x naaras -yhdistelmää liian pienen varianssin takia.



Kuva 7. Koiraskohtaiset liikkumattomien siittiöiden keskimääräiset osuudet ($\% \pm$ SD) ja keskimääräiset käyräviivaiset uintinopeudet (VCL) ($\mu\text{m/s} \pm$ SD) 0 vrk:n, 7 vrk:n ja 14 vrk:n säilytyksen jälkeen ($n = 5$ ovaarionesteen keskiarvo per koiras, joista kukin laskettu 3 toiston keskiarvona per ovaarioneste). Jokaisen matriisin sisällä kaikkien viiden koiraan siittiöt aktivoitiin erikseen viiden naaraan ovaarionesteessä.

4 TULOSTEN TARKASTELU JA PÄÄTELMÄT

Uhanalaisten kalakantojen emoparviviljelyssä joudutaan emokalojen sukutuotteita usein säilyttämään ennen varsinaisia emoparvihedelmöityksiä. Tämä koe osoitti, että järvilohen sukusolujen pitkällä säilytyksellä (14 vuorokautta) alhaisessa lämpötilassa (1 °C) on selkeä heikentävä vaikutus sekä naaraan että koiraan sukusolujen laatuun. Alkion elinkelpoisuuden vaihtelu johtui lähes kokonaan naaraasta (mädistä). Naaraan vaikutusta onkin yleisesti pidetty merkittävämpänä tekijänä mätin- ja poikasvaiheen kehitykselle ja elinkyvyille kuin koirasvanhemman (mm. Keckeis ym. 2000, Marteinsdottir ja Steinarsson 1998, Chambers ja Waiwood 1996). Myös Nagler ym. (2000) havaitsivat kirjolohella, että naarasvanhemmalla oli keskeinen rooli alkion eloonjäämisen määräävänä tekijänä, kun taas koirasvanhemmalla sitä ei ollut. Heidän mukaansa saattaa olla, että hedelmöitetyn mätimununan geneettinen osa eli naaraan ja koiraan DNA eivät ole yhtä tärkeitä alkion varhaiseen kehitykseen ja selviytymiseen kuin muut aineosat (mm. ruskuaisen sisältö ja naaraan mRNA).

Tutkimuksessani Saimaan järvilohen molempien sukupuolten sukusolujen laatuindikaattoreiden havaittu heikkeneminen tapahtui voimakkaimmin ensimmäisen säilytysviikon aikana. Kun hedelmöitykset tapahtuivat heti sukusolujen lypsämisen jälkeen, onnistuneesti kehittyneiden alkioiden osuudet olivat korkeita: 49 perheessä 50:stä keskimääräinen elinkyky kuoriutuessa oli yli 85 %. Seitsemän päivän sukusolujen varastoinnin jälkeen yleinen elinkyky sen sijaan puolittui. Tämä johti myös keskinäisen järjestyksen muuttumiseen genotyyppien kesken (täys- ja puolisisarperheet). Kahden viikon sukusolujen varastoinnin jälkeen elinkelpoisuus laski 83,3 %-yksikköä ensimmäiseen hedelmöityskertaan verrattuna. Nämä havainnot korostavat sitä, että järvilohen emokalastot tulisi perustaa heti sukusolujen lypsämisen jälkeen, jotta voidaan minimoida genotyyppien menetys ja tahaton valinta haudonta-ajan kriittisessä alkuvaiheessa.

Mädin ylikypsymistä eli ikääntymistä pidetään olennaisena rajoittavana tekijänä lohikalojen viljelyssä, ja sen haitalliset vaikutukset hedelmöittymiseen, haudontaan, kuoriutumiseen ja poikasten poikkeavuuksiin on dokumentoitu laajasti (esim. Barrett 1951, Komrakova ja Holtz 2009, Bahabadi ym. 2011, Eronen ym. 2021). Ovaarionesteen pH:n laskun tiedetään liittyvän mätimunien ovulaation jälkeiseen ikääntymiseen lohikaloilla, kuten kirjolohella ja Atlantin lohella (Lahnsteiner 2000, Mommens ym. 2015). Mommens ym. (2015) mukaan Atlantin lohella ovaarionesteen pH:n laskun myötä mädin hedelmöityksaste ja alkioiden eloonjääminen sekä poikasten selviytymisaste vähenivät merkittävästi. Lahnsteiner ym. (1999) taas havaitsivat, että taimenen (*Salmo trutta*) alkioiden eloonjääminen silmäpistevaiheeseen asti oli korkeinta (>80 %), kun ovaarionesteen pH vaihteli välillä 8,44–8,57. Tutkimuksessani järvilohella elinkyky oli korkeinta heti lypsän jälkeen hedelmöitettyillä mädeillä, jolloin ovaarionesteiden pH oli 8,24–8,52. Komrakova ja Holtz (2009) ehdottivat

kirjolohella tehtyjen koesarjojen perusteella, että ovaarionesteen pH-arvo ei saisi laskea alle 7,8:n ja happipitoisuuden tulisi olla vähintään 5 mg/l. Tutkimuksessani kahden järvilohinaaraan (A1 ja A2) ovaarionesteiden pH-arvot olivat 14 vrk:n säilytyksen jälkeen alle 7,8:n. Kyseisten naaraiden jälkeläisten elinkyky oli myös selvästi heikentynyt.

Tutkimuksessani järvilohen mädit säilytettiin suljetuissa astioissa haihtumisen välttämiseksi, mutta astioiden ilmaa ei uusittu hedelmöityskertojen välillä eikä mätimunakerrosten määrää rajoitettu. Näiden tekijöiden huomioon ottaminen, mukaan lukien lisähapen saanti, voi jossain määrin edistää sukusolujen elinkelpoisuutta pitkäaikaisen varastoinnin aikana (Stoss ja Holtz 1983a, Jensen ja Alderdice 1984, Komrakova ja Holtz 2009). Sukutuotteiden säilyvyyttä voidaan parantaa myös antibiooteilla, koska säilytyksen aikainen bakteerimäärien kasvu voi myös johtaa sekä mädin että maidin laadun heikkenemiseen (mm. Stoss ja Holtz 1983b, Holcomb ym. 2005). Matala lämpötila yhdistettynä antibioottihoitoon osoittautui Holcombin ym. (2005) tutkimusten mukaan tehokkaaksi keinoksi pidentää lohikalojen mädin onnistunutta säilytysaikaa. Antibiootteja ja ns. laimennusaineita (esim. isotonisia suolaliuoksia) käytetään myös siittiöiden elinkelpoisuuden pidentämiseen (Trigo ym. 2015, Bobe ja Labbé 2009, Contreras ym. 2020). Maidin säilyttämisessä käytetty 0–4 °C lämpötila vähentää lisäksi siittiöiden aineenvaihduntaa ja bakteerien kasvua (Contreras ym. 2020).

Mielenkiintoista on, että tutkimuksessani yhden naaraan (B1) jälkeläisten elinkyky neljässä perheessä nousi toisen ja kolmannen hedelmöitysjakson välillä, mikä viittaa mahdolliseen virheeseen tutkimusmenetelmässä. Yksi mahdollinen selitys voi olla munien pintakerroksen kuivuminen ensimmäisen säilytysviikon aikana, mikä on voinut johtaa näytteeksi otettujen munien heikompaan hedelmöittymiseen toisella hedelmöityskerralla. On myös huomionarvoista, että kyseisen naaraan ovaarionesteen pH laski vain ensimmäisen säilytysviikon aikana, kun taas 7–14 vrk:n välillä ei havaittu muutosta. Lopullinen syy elinkyvyn nousuun jäi kuitenkin tuntemattomaksi.

Välittömästi sukusolujen lypsämisen jälkeen siittiöiden liikkuvuustasot (liikkuvat siittiöt ja käyräviivainen uintinopeus (VCL)) olivat korkeat ja erosivat koiraiden välillä ainoastaan uintinopeuden suhteen. Molemmat siittiöiden liikkuvuusominaisuudet laskivat selvästi alkuperäisistä tasoistaan ensimmäisen sukusolujen säilytysviikon aikana, mutta VCL ei enää laskenut 7–14 vrk:n välillä. Molemmissa siittiöiden liikkuvuusominaisuuksissa koiraiden välinen vaihtelu oli suurempaa myöhempinä mittausaikoina. VCL-arvon ajallinen muutos riippui myös naaraasta ja koiras-naarasyhdistelmästä. Tämä viittaa siihen, että siittiöiden liikkeen heikkeneminen sukusolujen säilytyksen aikana riippui sekä ovaarionesteen laadusta että ovaarionesteen ja siittiöiden vuorovaikutuksesta. Kalojen ovaarioneste voi vaikuttaa siittiöiden suorituskykyyn muuttamalla niiden liikkuvuutta, mikä voi määrittää lopulta hedelmöitystuloksen (Zadmajid ym. 2019). Aiemmat lohikalatutkimukset ovat myös osoittaneet, että eri naaraiden ovaarionesteet vaikuttavat eri tavoin koiraiden siittiöiden uintikykyyn (Urbach ym. 2005, Rosengrave ym. 2008, Butts ym. 2012). Tässä työssä

kumpikaan siittiöiden liikkuvuusominaisuuksista ei ennustanut alkion elinkykyä hedelmöityshetkellä. Tästä voidaan päätellä, että siittiöiden liikkuvuuden erot eivät ilmeisesti johtaneet vaihteluihin perheiden lisääntymistuloksissa. Sen sijaan Rosengrave ym. (2016) havaitsivat kuningaslohella (*Oncorhynchus tshawytscha*), että koiraan siittiöiden uintinopeus naaraan ovaarionesteessä sekä koiraan geneettinen heterotsygoottisuusaste liittyivät positiivisesti elinkelpoisten alkioiden osuuteen. Tutkimuksessani ovaarionesteen vaikutus siittiöiden uintinopeuteen erosi myös naaraiden välillä koiraasta riippumatta. Ovaarionesteen pH:n laskemisen tiedetään myös vaikuttavan negatiivisesti siittiöiden uintikykyyn (Wojtczak ym. 2007).

Odotusten mukaisesti vanhemmista johtuva vaihtelu poikasten elinkyvyssä, hedelmöityksessä riippumatta, johtui enimmäkseen naaraista, kun taas koirasvaikutus pysyi merkityksettömänä. Aiemmat tutkimukset järviolohella ovat osoittaneet, että hyvinkin huonolaatuisella maidilla ja vähäisellä maitimäärällä on saatu aikaan hyviä hedelmöitystuloksia ja elinkykyisiä poikasia (J-P. Turkka, julkaisematon). Naaraan merkitys kasvoi tutkimuksessani huomattavasti myöhemmillä hedelmöityskertoina, mikä oletettavasti johtuu yksilöllisistä eroista mädinlaadussa naaraiden välillä (eli mätimunien ikääntymisessä) (Rime ym. 2004, Aegerter ym. 2005, Bahrekazemi ym. 2009, Samarin ja Policar 2019). Tätä päättelyä tukee mädin säilytyksen aikaisen ovaarionesteen pH:n laskun vaihtelu naaraiden välillä. Kahdeksalla kymmenestä naaraasta ovaarionesteen pH:n lasku oli voimakkaampaa ensimmäisen viikon aikana. Täysmatriisihedelmöityksessä naarasvaikutukset edustavat yhdistelmää maternaalisesta ympäristövaikutuksesta (mukaan lukien mädin laatuun liittyvät tekijät) ja suorasta geneettisestä vaihtelusta. Kuitenkin koirasvaikutusten puuttuminen alkion elinkyvyssä viittaa siihen, että additiiviset naaraan vaikutukset olivat todennäköisesti heikkoja.

Yhteenvedona voidaan todeta, että äärimmäisen uhanalaisen järviolohen sukusolujen lypsyn jälkeinen säilytys 1–2 viikon ajan jäädytettynä lisää voimakkaasti heterogeenisyyttä (valintaa) jälkeläisten elinkyvyssä eri genotyyppien välillä. Tämä voi vaarantaa jo ennestään vähäisen monimuotoisuuden säilymisen emokalaparvissa. Uhanalaisten kalakantojen emoparviviljelyssä sukutuotteiden säilytyksestä saatavien hyötyjen ja haittojen kanssa joudutaan kuitenkin tasapainottelemaan tapauskohtaisesti. Kulloinkin valittuun toimintatapaan vaikuttavat mm. kalakannan uhanalaisuusaste ja siinä jäljellä oleva geneettinen monimuotoisuus, emoparviin saatu perustajayksilöiden määrä ja laatu sekä ovulaation ajoittuminen eri yksilöillä. Perustettaessa emokalastoja luonnonkalojen sukutuotteista ei yksilöiden geneettistä taustaa useinkaan tunneta, joten matriisihedelmöityksissä osa naaraista ja koiraista saattavat olla geneettisesti toisilleen yhteensopimattomia, esimerkiksi lähisukulaisia. On todennäköistä, että useilla kalalajeilla pariutuminen luonnossa ei ole sattumanvaraista ja hedelmöitymisen onnistuminen riippuu koiraiden ja naaraiden yhteensopivuudesta (Wedekind ym. 1996, Marshall ja Evans 2005, Dziminski ym. 2008, Rosengrave ym. 2008). Naaraiden onkin todettu suosivan sellaisia koiraita, joilla on yhteensopiva

genotyyppi niiden fenotyypistä riippumatta (Zeh ja Zeh 1996, Jennions ja Petrie 2000). Järvilohen ja muiden uhanalaisten kalakantojen emoparviviljelyssä sukulaisuusastetta voidaan kontrolloida kasvatuksen myöhemmässä vaiheessa mm. yksilömerkkauksin ja DNA-analyysin tai pitämällä kasvatuksessa samaan aikaan useita eri emoparvi-ikäluokkia, jotka hedelmöitetään ristiin. Nämä toimenpiteet eivät kuitenkaan ole tila- ja resurssipuutteiden vuoksi aina mahdollisia.

Saimaan järvilohen jäljellä olevan geneettisen monimuotoisuuden ylläpitämisen optimoimiseksi on tärkeää pyrkiä mahdollisuuksien mukaan minimoimaan sukutuotteiden säilytysaika, vaikka jotkin naaras-koirasyhdistelmät jäisivätkin tekemättä. Sukutuotteet kannattaa lypsää välittömästi niiden kypsyttyä ja hedelmöittää kaikki mahdolliset emoparvien perustamiseen tarkoitetut yhdistelmät heti, kun ne on mahdollista tehdä. Tämän jälkeen jäljelle jääviä sukutuotteita voidaan säilyttää myöhemmin saatavia tai kypsyviä kaloja varten. Tämä mahdollistaa sen, että emoparveen saadaan enemmän perinnöllistä laajuutta eli erilaisia geneettisiä yhdistelmiä. Onkin tärkeää, että sukutuotteiden säilytysmenetelmiä kehitetään edelleen ottaen huomioon eri lajien lisääntymisbiologiset ominaisuudet. Antibiooteista, lisähapesta (myös mädille) ja mätimunakerrosten määrän vähentämisestä säilytysastiassa mahdollisesti saatavia hyötyjä on syytä tutkia myös järvilohen osalta.

KIITOKSET

Kiitokset Anssi Karvoselle ja Matti Janhuselle työn ohjauksesta, Jorma Piroselle osallistumisesta koejärjestelyn suunnitteluun sekä Jukka Kekäläiselle maidin aktivointitesteistä. Käytännön toteutukseen saatiin avustusta Luken Enonkosken kalanviljelylaitoksen henkilöstöltä.

Enonkoskella 26.9.2022

Juha-Pekka Turkka

KIRJALLISUUSLUETTELO

- Aegerter S., & Jalabert B. 2004. Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 23: 59-71.
- Aegerter S., Jalabert B. & Bobe J. 2005. Large scale real-time PCR analyses of mRNA abundance in rainbow trout eggs in relationship with egg quality and post-ovulatory ageing. *Molecular Reproduction and Development* 72: 377-385.
- Aho T., Piironen J. & Pursiainen M. 2002. Avain viljeltävien taimen-, harjus- ja siikaemokalastojen geneettiseen tietokantaan Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen vesiviljelyssä. Kala- ja riistaraportteja nro 253.
- Bahabadi M.N., Shoaie A. & Lokman M. 2011. Effects of storage time, sex steroids and media composition on egg viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 315: 306-311.
- Bahrekazemi M., Matinfar A., Soltani M., Abtahi B., Pusti I. & Mohagheghi A. 2009. The relation between egg viability, selected aspect of egg and ovarian fluid composition and time of stripping in endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 4: 306-315.
- Barrett I. 1951. Fertility of salmonoid eggs and sperm after storage. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 8: 125-133.
- Bizuayehu T.T., Mommens M., Sundaram A.Y.M., Dhanasiri A.K.S. & Babiak I. 2019. Postovulatory maternal transcriptome in Atlantic salmon and its relation to developmental potential of embryos. *BMC Genomics* 20(315).
- Bobe J. & Labbé C. 2009. Chilled storage of sperm and eggs. In: E Cabrita, V Robles, P Herráez (eds) *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species* 219- 235.
- Butts I.A.E., Johnson K., Wilson C.C. & Pitcher T.E. 2012. Ovarian fluid enhances sperm velocity based on relatedness in lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Theriogenology* 78: 2105-2109.
- Chambers R.C. & Waiwood K.G. 1996. Maternal and seasonal differences in egg sizes and spawning characteristics of captive Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 53: 1986-2003.
- Contreras P., Dumorne K., Ulloa-Rodriguez P., Merino O., Figueroa E., Farias J.G., Valdebenito I. & Risopatron J. 2020. Effects of short-term on sperm function in fish semen: a review. *Reviews in Aquaculture* 12: 1373-1389.

- Dziminski M.A., Roberts J.D. & Simmons L.W. 2008. Fitness consequences of parental compatibility in the frog *Crinia georgiana*. *Evolution* 62: 879–886.
- Eronen A., Kekäläinen J., Piironen J., Hyvärinen P., Huuskonen H., Janhunen M., Yaripour S. & Kortet R. 2021. Sperm motility and offspring pre- and post-hatching survival in hybridization crosses among a landlocked and two anadromous Atlantic salmon populations: implications for conservation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 78: 483–492.
- Eskelinen P., Piironen J. & Primmer C. 2002. Monimuotoisuuden säilyttäminen lohen poikasviljelyssä. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos. Kalantutkimuksia nro 181.
- Fisch K.M., Kozfkay C.C., Ivy J.A., Ryder O.A. & Waples R.S. 2015. Fish hatchery genetic management techniques: integrating theory with implementation. *North American Journal of Aquaculture* 77: 343–357.
- Fraser D.J. 2008. How well captive breeding programs conserve biodiversity? A review of salmonids. *Evolutionary Applications* 1: 535–651.
- Holcomb M., Cloud J.G. & Ingermann R.L. 2005. Impact of bacteria on short-term storage of salmonid eggs. *Aquaculture Research* 36: 1555–1561.
- Hutchings A.J., Ardren W.R., Barlaup B.T., Bergman E., Clarke K.D., Greenberg L.A., Lake C., Piironen J., Sirois P., Sundt-Hansen L.E. & Fraser D.J. 2019. Life-history variability and conservation status of landlocked Atlantic salmon: an overview. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 76: 1697–1708.
- Huusko A., Louhi P., Marttila M., Korhonen P.K. & van der Meer O. 2021. 40 vuotta koskikunnostuksia Suomessa. Yhteenveto seurantatutkimuksista. Luonnonvara- ja biotalouden tutkimus 52/2021. Luonnonvarakeskus. Helsinki.
- Hyvärinen E., Juslén A., Kemppainen E., Uddström A. & Liukko U.-M. (toim.). 2019. Suomen lajien uhanalaisuus – Punainen kirja 2019. Ympäristöministeriö & Suomen ympäristökeskus. Helsinki.
- Inanan B.E. 2020. Fertilization rate, motility, lipid peroxidation and pH changes after chilled storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs and spermatozoa by a RMPI medium. *Aquaculture Research* 51: 222–231.
- Jennions M.D. & Petrie M. 2000. Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biological Reviews* 75: 21–64.
- Jensen J. & Alderdice D. 1984. Effect of temperature on short-term storage of eggs and sperm of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Aquaculture* 37: 251–265.

- Kaijomaa V.-M., Munne P., Piironen J., Pursiainen M. & Turunen T. 2003. Järvilohistrategia. Saimaan järvilohikannan säilymisen ja kestävän käytön turvaaminen. Maa- ja metsätalousministeriö. Kala- ja riistahallinnon julkaisuja 66.
- Kaijomaa V.-M., Turunen T. & Peura H. 2011. Saimaan järvilohen hoito-ohjelma. Pohjois-Karjalan elinkeino-, liikenne- ja ympäristökeskuksen julkaisuja 3/2011.
- Keckeis H., Bauer-Nemeschkal E., Menshutkin V.V., Nemeschkal H.L. & Kamler E. 2000. Effects of female attributes and egg properties on offspring viability in a rheophilic cyprinid, *Chondrostoma nasus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57: 789-796.
- Kime D.E., Van Look K.J.W., McAllister B.G., Huyskens G., Rurangwa E. & Ollevier F. 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 130: 425-433.
- Komrakova M. & Holtz W. 2009. Factors responsible for successful chilled storage of unfertilized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Aquaculture* 286: 156-163.
- Lahnsteiner F., Weismann T. & Patzner R.A. 1999. Physiological and biochemical parameters for egg quality determination in lake trout, *Salmo trutta lacustris*. *Fish Physiology Biochemistry* 20: 375-388.
- Lahnsteiner F. 2000. Morphological, physiological and biochemical parameters characterizing the over-ripening of rainbow trout eggs. *Fish Physiology and Biochemistry* 23: 107-118.
- MacGrimmon H.R. & Gots B.L. 1979. World distribution of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 36: 422-457.
- Makkonen J., Westman K., Pursiainen M., Heinimaa P., Eskelinen U., Pasanen P. & Kumm P. 2000. Viljelykantarekisteri. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen kalanviljelylaitoksissa ja maitipankissa säilytyksessä olevat kalalajit ja -kannat. Kala- ja riistaraportteja nro 200.
- Mansour N., Lahnsteiner F., McNiven M.A. & Richardson G.F. 2008. Morphological characterization of Arctic char, *Salvelinus alpinus*, eggs subjected to rapid post-ovulatory aging at 7 °C. *Aquaculture* 279: 204-208.
- Marshall DJ. & Evans JP. 2005. The benefits of polyandry in the freespawning polychaete *Galeolaria caespitosa*. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 735-740.

- Marteinsdottir G. & Steinarsson A. 1998. Maternal influence on the size and viability of Iceland cod *Gadus morhua* eggs and larvae. *Journal of Fish Biology* 52: 1241-1258.
- Marttila M., Orell P., Erkinaro J., Romakkaniemi A., Huusko A., Jokikokko E., Vehanen T., Piironen J., Huhmarniemi A., Sutela T., Saura A. & Mäki-Petäys A. 2014. Rakennettujen jokien kalataloudelle aiheutuneet vahingot ja kalatalousvelvoitteet. RKTL:n työraportteja 6.
- Mommens M., Storset A. & Babiak I. 2015. Some quantitative indicators of postovulatory aging and its effect on larval and juvenile development of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Theriogenology* 84: 170-176.
- Morrel C.H. 1998. Likelihood ratio testing of variance components in the linear mixed-effects model using restricted maximum likelihood. *Biometrics* 54(4): 1560-1568.
- Nagler J.J., Parsons J.E. & Cloud J.G. 2000. Single pair mating indicates maternal effects on embryo survival in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 184: 177-183.
- Parrish D.L., Behnke R.J., Gephard S.R., McCormick S.D. & Reeves G.H. 1998. Why aren't there more Atlantic salmon (*Salmo salar*)? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55: 281-287.
- Piironen J. 1995. Kalakantojen säilyttäminen ja emokalastojen geneettinen hoito. Teoksessa: Heinimaa P. & Juntunen K. (toim.), Kalakantojen monimuotoisuuden hoito - Valtion kalanviljelyn XIX neuvottelupäivät. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos. Kalatutkimuksia 96:6-16.
- Rime H., Guitton N., Pineau C., Bonnet E., Bobe J. & Jalabert B. 2004. Post-ovulatory ageing and egg quality: A proteomic analyses of rainbow trout coelomic fluid. *Reproductive biology and Endocrinology* 2(26).
- Rosengrave P., Gemmell N.J., Metcalf V., McBride K. & Montgomerie R. 2008. A mechanism for cryptic female choice in chinook salmon. *Behavioral Ecology* 19: 1179-1185.
- Rosengrave P., Montgomerie R. & Gemmell N. 2016. Cryptic female choice enhances fertilization success and embryo survival in chinook salmon. *Proceedings of the Royal Society B* 283:20160001.
- Samarin A.M., Policar T. & Lahnsteiner F. 2015. Fish oocyte ageing and its effect on egg quality. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 23: 302-314
- Samarin A.M. & Policar T. 2019. Cellular and molecular changes associated with fish oocyte ageing. *Reviews in Aquaculture* 11: 619-630.

- Self S.G. & Liang K.-Y. 1987. Asymptotic properties of maximum likelihood estimators and likelihood ratio tests under nonstandard conditions. *Journal of the American Statistical Association* 398: 605–610.
- Stoss J. & Holtz W. 1983. Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture* 30: 229-236.
- Stoss J. & Holtz W. 1983. Successful storage of chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa for up to 34 days. *Aquaculture* 31: 269–274.
- Trigo P., Merino O., Figueroa E., Valdebenito I., Sánchez R., Risopatrón J. 2015. Effect of short-term semen storage in salmon (*Oncorhynchus mykiss*) on sperm functional parameters evaluated by flow cytometry. *Andrologia* 47: 407-411.
- Urbach D., Folstad I. & Rudolfson G. 2005. Effects of ovarian fluid on sperm velocity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 57: 438-444.
- Valkonen N. & Laakkonen M. 2015. Pielisen alueen virtavedet järvitaimenen ja järvilohen näkökulmasta. Future Missions Oy:n julkaisu 1:2015.
- Verstegen J., Iguer-Ouada M. & Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57: 149-179.
- Viveiros A.T.M., Isaú Z., Figueiredo H.C.P, Leite M.A.S. & Maria A.N. 2010. Gentamycin controls bacterial growth during refrigerated storage of piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, semen. *Journal of the World Aquaculture Society* 41(1): 57-65.
- Vuorinen, J. 1982. Little genetic variation in the Finnish lake salmon, *Salmo salar sebago* (Girard). *Hereditas* 97: 189–192.
- Wedekind C., Chapuisat M., Macas E. & Rulicke T. 1996. Non-random fertilization in mice correlates with the MHC and something else. *Heredity* 77: 400–409.
- Wojtczak M., Dietrich G.J., Słowińska M., Dobosz S., Kuźmiński H. & Ciereszko A. 2007. Ovarian fluid pH enhances motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Aquaculture* 270: 259-264.
- Zadmajid V., Myers J.N., Sørensen S.R., Butts I.A.E. 2019. Ovarian fluid and its impacts on spermatozoa performance in fish: A review. *Theriogenology* 132: 144–152.

Zeh J.A. & Zeh D.W. 1996. The evolution of polyandry I: intragenomic conflict and genetic incompatibility. *Proceedings of the Royal Society London B* 264: 69–75.

LIITE 1. PERHEKOHTAISET ELINKYKYPROSENTIT

Liite 1 (A). Perhekohtaiset elinkykyprosentit (kolmen haudontayksikön keskiarvo \pm SD) A-matriisikalojen hedelmöityksistä.

Elinvyky-% (keskiarvo \pm SD)			
Perheet, A-matriisi ♀, ♂	Säilytysaika		
	0 vrk	7 vrk	14 vrk
A1,A6	99,3 (\pm 1,1)	22,4 (\pm 16,0)	9,3 (\pm 14,5)
A1,A7	98,0 (\pm 2,0)	29,4 (\pm 11,6)	12,1 (\pm 2,1)
A1,A8	98,0 (\pm 2,0)	26,2 (\pm 11,1)	9,8 (\pm 2,3)
A1,A9	94,1 (\pm 3,4)	23,3 (\pm 17,9)	12,8 (\pm 11,9)
A1,A10	98,0 (\pm 2,0)	46,7 (\pm 9,3)	10,8 (\pm 2,5)
A2,A6	94,7 (\pm 4,2)	23,3 (\pm 3,1)	4,9 (\pm 5,4)
A2,A7	88,2 (\pm 13,7)	44,5 (\pm 7,6)	9,2 (\pm 9,2)
A2,A8	98,0 (\pm 3,4)	25,5 (\pm 4,8)	2,0 (\pm 3,5)
A2,A9	98,0 (\pm 2,0)	30,5 (\pm 13,1)	0,7 (\pm 1,2)
A2,A10	96,6 (\pm 1,2)	33,7 (\pm 9,1)	7,4 (\pm 3,0)
A3,A6	90,9 (\pm 6,2)	28,0 (\pm 11,3)	5,2 (\pm 5,7)
A3,A7	95,4 (\pm 4,5)	40,1 (\pm 19,2)	4,5 (\pm 1,1)
A3,A8	74,0 (\pm 9,8)	43,6 (\pm 19,5)	3,9 (\pm 3,4)
A3,A9	92,2 (\pm 6,8)	40,2 (\pm 10,5)	2,6 (\pm 1,1)
A3,A10	94,3 (\pm 3,3)	58,7 (\pm 20,5)	3,2 (\pm 1,1)
A4,A6	95,1 (\pm 2,8)	60,0 (\pm 33,9)	22,0 (\pm 2,9)
A4,A7	96,3 (\pm 3,2)	55,7 (\pm 13,2)	29,6 (\pm 8,2)
A4,A8	95,6 (\pm 2,1)	54,9 (\pm 29,1)	29,6 (\pm 19,4)
A4,A9	97,5 (\pm 1,1)	66,7 (\pm 0,6)	32,9 (\pm 10,8)
A4,A10	96,3 (\pm 3,2)	60,4 (\pm 34,3)	43,3 (\pm 18,6)
A5,A6	98,0 (\pm 3,4)	56,9 (\pm 26,1)	45,3 (\pm 9,5)
A5,A7	99,4 (\pm 1,1)	65,2 (\pm 11,1)	41,2 (\pm 2,4)
A5,A8	96,7 (\pm 4,1)	73,9 (\pm 26,8)	26,9 (\pm 2,5)
A5,A9	100 (\pm 0,0)	75,4 (\pm 19,4)	34,4 (\pm 3,4)
A5,A10	98,7 (\pm 1,1)	68,3 (\pm 16,7)	45,8 (\pm 19,7)

Liite 1 (B). Perhekohtaiset elinkykyprosentit (kolmen haudontayksikön keskiarvo \pm SD) B-matriisikalojen hedelmöityksistä.

Elinkyky-% (keskiarvo \pm SD)			
Perheet, B-matriisi ♀, ♂	Säilytysaika		
	0 vrk	7 vrk	14 vrk
B1,B6	99,4 (\pm 1,1)	28,5 (\pm 14,3)	26,3 (\pm 5,6)
B1,B7	98,7 (\pm 1,1)	15,5 (\pm 5,8)	44,1 (\pm 7,0)
B1,B8	98,1 (\pm 0,0)	30,9 (\pm 4,9)	41,1 (\pm 15,2)
B1,B9	96,9 (\pm 2,8)	27,3 (\pm 10,3)	35,3 (\pm 7,3)
B1,B10	95,6 (\pm 4,3)	27,6 (\pm 2,8)	42,6 (\pm 7,7)
B2,B6	97,3 (\pm 1,2)	75,0 (\pm 14,3)	24,7 (\pm 18,9)
B2,B7	100 (\pm 0,0)	59,0 (\pm 18,6)	29,6 (\pm 10,0)
B2,B8	95,4 (\pm 3,0)	53,5 (\pm 17,4)	37,0 (\pm 12,3)
B2,B9	99,3 (\pm 1,1)	60,4 (\pm 9,3)	25,4 (\pm 12,7)
B2,B10	97,3 (\pm 3,1)	58,0 (\pm 15,6)	35,1 (\pm 8,1)
B3,B6	91,5 (\pm 10,0)	26,9 (\pm 12,4)	0,7 (\pm 1,2)
B3,B7	96,7 (\pm 1,1)	30,7 (\pm 16,0)	0,0 (\pm 0,0)
B3,B8	88,8 (\pm 7,9)	36,9 (\pm 20,1)	1,3 (\pm 2,3)
B3,B9	97,3 (\pm 1,1)	32,5 (\pm 15,2)	0,7 (\pm 1,2)
B3,B10	94,7 (\pm 4,2)	18,0 (\pm 14,4)	3,4 (\pm 4,2)
B4,B6	98,0 (\pm 3,4)	32,3 (\pm 23,2)	21,9 (\pm 10,1)
B4,B7	92,9 (\pm 3,0)	48,4 (\pm 21,9)	14,0 (\pm 12,5)
B4,B8	95,5 (\pm 1,1)	33,8 (\pm 19,1)	20,6 (\pm 7,9)
B4,B9	95,5 (\pm 1,3)	33,3 (\pm 13,7)	5,3 (\pm 4,1)
B4,B10	96,1 (\pm 0,1)	37,3 (\pm 8,5)	7,8 (\pm 3,8)
B5,B6	93,7 (\pm 2,8)	78,2 (\pm 6,8)	13,4 (\pm 4,7)
B5,B7	88,5 (\pm 3,3)	65,2 (\pm 11,9)	5,3 (\pm 1,1)
B5,B8	88,5 (\pm 10,7)	68,4 (\pm 5,8)	9,7 (\pm 0,1)
B5,B9	91,0 (\pm 5,9)	72,2 (\pm 10,8)	18,7 (\pm 3,0)
B5,B10	94,3 (\pm 1,9)	66,0 (\pm 9,7)	20,1 (\pm 14,2)