

KALA- JA RIISTARAPORTTEJA nro 367

*Teija Aho
Jorma Piironen
Markku Pursiainen*

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen harjuksen
emokalastojen geneettinen monimuotoisuus
mikrosatelliittianalyysien perusteella

Helsinki 2005

Teija Aho, Jorma Piironen ja Markku Pursiainen

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen harjuksen emokalastojen geneettinen monimuotoisuus mikrosatelliittianalyysojen perusteella

Vesiviljelyn tulosityksikkö

Luonnonkalakantojen hoidon yhtenä päätehtävänä on säilyttää kantojen eriytyneisyys ja perinnöllinen monimuotoisuus. Koska valtion kalanviljelyllä on tässä keskeinen rooli, päätettiin Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen vesiviljelyn tulosityksikössä 1990-luvun lopulla ryhtyä kartoittamaan emokalastojen perinnöllistä tilaa, erilaisuutta ja monimuotoisuutta eli biodiversiteettiä.

Tällä työllä on luotu ensimmäistä kertaa kattava, samoihin tutkimusmenetelmiin perustuva viljelyssä olevien taimenkantojen perinnöllisiä ominaisuuksia ja rakennetta kuvaava tietokanta, joka mahdollistaa vertailukelpoisen perusaineiston käytön emokalastoja vuosien mittaan uusittaessa, viljelytoimintaa kehitettäessä, sekä vertailtaessa villien ja viljeltyjen harjuskantojen ominaisuuksia.

Tässä työssä käytetty aineisto on kerätty valtion kalanviljelylaitoksilla kasvatetuista eri harjuskantojen emokalastoista lokakuun 1997 ja toukokuun 1999 välisenä aikana. Lisäksi analysoitiin Perämerestä Krunnien saarten ympäristöstä saatuja harjuskantoja, koska ko. kanta oli suunniteltu otettavaksi emoviljelyyn (emoparvi perustettiin v. 2000). Näytteitä otettiin kaikkiaan 11 viljelyssä olevasta harjuskannasta 21 emoparvesta, mutta resursseja analyysojen tekemiseen oli yhteensä 13 parven näytteisiin.

taimenet, MS-DNA, DNA-mikrosatelliitit, emokalanviljely

Kala- ja riistaraportteja 367

951-776-510-X

1238-3325

16 s. + liite

suomi

julkinen

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos
Viikinkaari 4, PL 2
00791 HELSINKI
Puh. 020 57511 Faksi 020 5751 201
<http://www.rktl.fi/tutkimuslaitos/julkaisut> (pdf)

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos
Viikinkaari 4, PL 2
00791 HELSINKI
Puh. 020 57511 Faksi 020 5751 201
www.rktl.fi

Sisällys

1. JOHDANTO.....	1
2. AINEISTO.....	2
3. MENETELMÄT.....	3
3.1. Näytemäärä.....	3
3.2. Geneettiset analyysit.....	3
3.3. Monimuotoisuus.....	3
3.4. Efektiivinen populaatiokoko.....	4
3.4.1 Perustajayksilöt.....	4
3.4.2 Teoreettinen efektiivinen populaatiokoko (N_e).....	4
3.4.3 Toteutunut efektiivinen populaatiokoko.....	5
3.4.4 Geneettinen pullonkaula.....	5
3.5. Yksilöiden välinen sukulaisuus.....	5
3.6. Kantojen väliset erot.....	6
3.7. Kantojen väliset geneettiset etäisyydet.....	6
4. TARKASTELUTAPA.....	7
5. TULOKSET.....	8
5.1 Harjusparvien erot ja geneettinen etäisyys.....	8
5.2 Harjuskantojen erot ja geneettinen etäisyys.....	8
5.3 Harjusparvien geneettinen monimuotoisuus.....	9
5.4 Harjuskantojen geneettinen monimuotoisuus.....	10
5.5 Harjusparvien sukulaisuusaste ja efektiivinen populaatiokoko.....	11
6. KANTAKOHTAINEN TARKASTELU JA SUOSITUKSET.....	13
KIRJALLISUUS.....	16
LIITE: Eri mikrosatelliittilokuksissa havaittu alleelimäärä lokuksittain.....	17

1. Johdanto

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksella on viljelyssä 12 alkuperäistä kalalajia ja näistä lähes 70 eri kantaa, rapu, sekä lisäksi eräitä vieraita lajeja (Makkonen ym. 2000). Näistä suurin osa on mädintuotantoviljelyssä, eli laitoksille perustetaan ja niissä ylläpidetään emokalastoja, joista lypsetty mäti siirtyy pääosin yksityisen poikaskasvatuksen kautta istutuksiin. Emokalojen perinnöllinen aines välittyy siten niiden jälkeläisiin eli takaisin luontoon ja sen olosuhteisiin.

Luonnonkalakantojen hoidon yhtenä päätehtävänä on säilyttää kantojen eriytyneisyys ja perinnöllinen monimuotoisuus. Koska valtion kalanviljelyllä on tässä keskeinen rooli, päätettiin Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen vesiviljelyn tulosityksikössä 1990-luvun lopulla ryhtyä kartoittamaan emokalastojen perinnöllistä tilaa, erilaisuutta ja monimuotoisuutta eli biodiversiteettiä. Toiminnalla on ollut ja tulee olemaan suuri vaikutus mm. vesiviljelyn toimintajärjestelmän menettelyohjeisiin.

Tämä käsillä oleva kirjoitus on kolmas sarjassa, jonka ensimmäisessä osassa (Aho ym. 2002) selostettiin geneettisen tietokannan perusteita, rakennetta ja mittaristoa ja toisessa osassa esiteltiin viljelyssä olevien taimenkantojen emoparviem perinnöllisen monimuotoisuuden tilaa. Tässä kirjoituksessa käsitellään viljelyssä olevia harjuskantoja. Siikojen koskevat mikrosatelliitti-DNA –selvitysten tulokset on tarkoitettu käsitellä julkaistavaksi myöhemmin.

Tällä työllä on luotu ensimmäistä kertaa kattava, samoihin tutkimusmenetelmiin perustuva viljelyssä olevien harjuskantojen perinnöllisiä ominaisuuksia ja rakennetta kuvaava tietokanta, joka mahdollistaa vertailukelpoisen perusaineiston käytön emokalastoja vuosien mittaan uusittaessa, viljelytoimintaa kehitettäessä, sekä vertailtaessa villien ja viljeltyjen harjuskantojen ominaisuuksia.

2. Aineisto

Tässä työssä käytetty aineisto on kerätty valtion kalanviljelylaitoksilla kasvatetuista eri harjuskantojen emokalastoista lokakuun 1997 ja toukokuun 1999 välisenä aikana. Lisäksi analysoitiin Perämerestä Kruunien saarten ympäristöstä saatuja harjuskantoja, koska ko. kanta oli suunniteltu otettavaksi emoviljelyyn (emoparvi perustettiin v. 2000). Näytteitä otettiin kaikkiaan 11 viljelyssä olevasta harjuskannasta 21 emoparvesta, mutta resursseja analyysien tekemiseen oli yhteensä 13 parven näytteisiin. Käsitellyt parvet olivat seuraavat (kirjainyhdistelmä on kannasta tässä raportissa käytetty lyhenne, numero kertoo kuoriutumivuoden):

ESA97	Etelä-Saimaan harjus 1997
ESA97ss	Etelä-Saimaan harjus 1997, luonnosta saadut emokalat
PUR90V	Puruveden harjus 1990, HRPUR86 ja HRPUR89 parvien jälkeläistö
PUR95	Puruveden harjus 1995
PUR98ss	Puruveden harjus 1998, luonnosta saadut emokalat
LIE95	Lieksanjoen harjus 1995
LIE96	Lieksanjoen harjus 1996
LIE97ss	Lieksanjoen harjus 1997, luonnosta saadut emokalat
RAU93	Rautalammin reitin harjus 1993
RAU97	Rautalammin reitin harjus 1997
KAJ97	Kajaaninjoen harjus 1997
KIT95	Kitkajärven harjus 1995
KIT90ss	Kitkajärven harjus, 1990-1993 luonnosta saadut emokalat
KIJss	Kitkajoen harjus, luonnosta saadut emokalat
IJO83-89	Iijoen harjus 1983, 1985, ja 1989, yhdistetty emokalasto
KEM85	Kemijoen harjus yhdistetty emokalasto 1983-1986 ja 1989
PER99ss	Perämeren (Ulkokruunni) harjus, saaliiksi saadut luonnonkalat
JUU90	Juutuanjoen harjus 1990

Muutamasta harjuskannasta (mm. HRESA, HRLIE, HRPUR ja HRRAU) on analysoitu kaksi emoparvea. Lisäksi analysoitiin Etelä-Saimaan, Puruveden ja Lieksanjoen luonnonemoista emoparviin perustamiseen vv. 1997-1999 käytettyjä yksilöitä. Analysoidut parvet on valittu pääsääntöisesti siten, että ne edustaisivat mahdollisimman hyvin alkuperäistä luonnonpopulaatiota (yleensä vain 1. laitospolven kalastot). Saman kannan rinnakkaisparvien avulla oli tarkoituksena selvittää, paitsi eri parvien välisiä eroja, myös mahdollisia parvien perustamiseen ja viljelykäytäntöihin liittyviä perinnölliseen monimuotoisuuteen vaikuttaneita tekijöitä.

3. Menetelmät

3.1. Näytemäärä

Harjuskantojen monimuotoisuustaso on selvitetty analysoimalla 4-8 muuntelevaa mikrosatelliittigeenipaikkaa (*Cocl23*, *FGT1*, *MST73*, *MST85*, *One2*, *BFRO18*, *Ogo2* ja *Thy-A-181*) kustakin kannasta. Analysoitujen yksilöiden määräksi on pyritty saamaan 50, mutta käytännössä kaikki yksilöt harvoin toimivat kaikkien geenipaikkojen osalta. Poikkeuksellisen suuria vaikeuksia oli Kitkajoen ja Kitkajärven näytteissä, joiden DNA ei monistunut kunnolla eri eristysmenetelmistä huolimatta. Kitkajoen osalta yksilöitä monistui niin vähän, että luotettavat analyysit eivät ole mahdollisia. Mikäli yksilömäärä jonkin geenipaikan osalta on alhaisempi kuin 50, aineisto on korjattu vastaamaan tavoiteyksilömäärää Ewensin (1972) korjausmenetelmää käyttäen. Tässä raportissa esitetyt tulokset ovat siten suoraan vertailukelpoisia analysoidusta yksilömäärästä riippumatta.

Tutkituissa harjusparvissa eri mikrosatelliittilokuksissa havaittu alleelimäärä (laskettu 50 yksilöä kohti) on raportin liitteenä.

3.2. Geneettiset analyysit

Laboratorioanalyysit on 4 kannan osalta tehty Helsingin yliopiston Populaatiobiologian osaston Molekyyliekologian laboratoriossa (vastaava tutkija M. Koskinen) ja 7 kannan osalta Uppsalan yliopiston Eläinekologian laitoksen molekyylilaboratoriossa (vastaava tutkija T. Aho). Käytetyistä menetelmistä ja niiden soveltuvuudesta ks. lähemmin Aho (1999). Aineiston analysoinnin ja tulosten tulkinnan osalta vastuullinen tutkija on tässä työssä T. Aho, tietokannan ovat laatineet T. Aho ja J. Piironen.

3.3. Monimuotoisuus

Monimuotoisuusindekseinä on käytetty (ks. myös Aho ym. 2002):

- havaittua geenimuotojen määrää (saman geenin eri muodot eli alleelit; jokaisella yksilöllä on kaksi kopiota kustakin geenistä, joista toinen on peritty naaraalta ja toinen koiraalta). Harvinaiseksi geenimuodoksi sanotaan sellaista, jonka taajuus on alle 5%.
- havaittua heterotsygotia-astetta (H_o ; erilaiset geenimuodot omaavien yksilöiden suhteellinen osuus).
- odotettua heterotsygotia-astetta (H_e ; geenidiversiteetti, geenimuotojen määrän perusteella laskettu odotettu heterotsygotia-aste). Geenidiversiteetti vastaa odotettua heterotsygotia-astetta vastaavassa, satunnaisesti lisääntyvässä populaatiossa. Mikäli kannan sisällä yksilöt lisääntyvät satunnaisesti eikä esimerkiksi sukusiitosta tai yksilömäärän romahduksia esiinny, noudattavat geenimuotojen taajuudet nk. Hardy-Weinbergin taajuuksia. Populaation geenimuotojen taajuuksien sanotaan tällöin olevan Hardy-Weinbergin tasapainotilassa. Tällöin havaittu heterotsygotia-aste ja geenidiversiteetti ovat suunnilleen yhtä suuria. Poikkeamat H-W-tasapainotilanteesta on tilastollisesti testattu.

3.4. Efektiivinen populaatiokoko

3.4.1 Perustajayksilöt

Perustajayksilöillä tarkoitetaan viljelyparven alkuhedelmöityksissä käytettyjä naaraita ja koiraita. Näiden emojen ominaisuuksista määräytyy hyvin pitkälle se, kuinka monimuotoinen viljeltävä emoparvi on geneettisesti (vrt. efektiivinen koko). Teoriassa parhaimmillaankin emoparveen voidaan saada korkeintaan sama määrä perinnöllistä muuntelua kuin perustajayksilöissä on olemassa. Käytännössä toteutuneeseen efektiiviseen kokoon vaikuttavat mm. emojen paritustavat, jälkeläismäärän vaihtelu ja kuolevuus ennen parven sukukypsyyttä.

3.4.2 Teoreettinen efektiivinen populaatiokoko (N_e)

Laskennallinen tunnusluku N_e kuvaa lisääntyvän eli perinnöllisessä mielessä tehokkaan populaation kokoa, mikä on aina pienempi kuin populaation yksilöiden kokonaisuus. Tarkkaan ottaen efektiivistä populaatiokokoa kuvaavilla kaavoilla lasketaan, millä todennäköisyydellä sama geeni kahdella yksilöllä on peräisin samalta naaralta ja samalta koiralta. Sen laskemiseen ideaalipopulaatiossa (mm. satunnainen hedelmöitys, vakaa populaatiokoko, tasainen sukupuolijakauma, Poisson-jakaumaa noudattava perhekoon jakauma ja lisäksi oletetaan, ettei valintaa tapahdu) käytetään eri tilanteissa seuraavia kaavoja:

a) Käytetään eri määrä naaraita ja/tai koiraita:

$$N_e = (4 \times N_n \times N_k) / (N_n + N_k),$$

N_n = naaraiden lukumäärä ja N_k = koiraiden lukumäärä.

b) Populaatiokoko vaihtelee peräkkäisissä vuosiluokissa:

$$N_e = (1/t \times \sum 1/N_i) - 1,$$

missä t = vuosiluokka ja N_i = populaatiokoko vuosiluokassa t

c) Populaatiokoko vaihtelee ja käytetään eri määrä naaraita ja/tai koiraita:

$$N_e = [1/t \times \sum (1/4 N_n + 1/4 N_k)]^{-1},$$

symbolit ovat samat kuin edellä.

Jos populaatiokoot (N_i) ovat suhteellisen suuria, on efektiivinen populaatiokoko likimain populaatiokokojen harmoninen keskiarvo:

$$1/N_e = 1/t \times \sum 1/N_i$$

d) Jälkeläisten lukumäärä/emokala vaihtelee, populaatiokoko pysyy vakiona:

$$N_e = (4N-2)/(V_k+2),$$

V_k = jälkeläismäärän varianssi/emokala.

Siis jos kaikilla naarilla ja koirilla on yhtä monta jälkeläistä tai perheiden jälkeläismäärä on tasattu (eli $V_k = 0$), on:

$$N_e = 2N-1$$

eli huomattavasti suurempi kuin käytettyjen emojen lukumäärien perusteella laskettu efektiivinen populaatiokoko.

3.4.3 Toteutunut efektiivinen populaatiokoko

Mikrosatelliittiaineistosta laskettu toteutunut efektiivinen populaatiokoko, eli lisääntyvien yksilöiden määrä on laskettu Hillin (1981) metodia käyttäen. Tämä menetelmä edellyttää, että populaatioiden välillä ei ole muuttoliikettä, ts. että populaatiot ovat toisistaan eristyneitä. Mikäli muuttoliikettä (tai kantojenvälisiä istutuksia) esiintyy, arvio efektiivisestä populaatiokoosta saattaa olla liian suuri. Menetelmä on sitä tarkempi, mitä suurempi analysoitu yksilömäärä on, joten esimerkiksi noin 20 yksilön otoksiin on suhtauduttava varauksella. Edelleen, mitä vanhemmasta parvesta on kysymys, sitä enemmän yksilöitä on todennäköisesti kuollut. Tämä pienentää aineistosta laskettua efektiivistä perustajamäärää. Nuorista emokalaparvista tehdyistä otoksista laskettu efektiivinen populaatiokoko on siten luotettavampi kuin jo ikääntyneistä.

3.4.4 Geneettinen pullonkaula

Geneettiseksi pullonkaulaksi kutsutaan tilannetta, jossa populaation lisääntyvien yksilöiden määrä on romahtanut hyvin pieneksi. Tämä näkyy analyysituloksissa heterotsygotiaylijäämänä, mikä on tilastollisin testein osoitettavissa. Kyseinen testi vaatii kuitenkin vähintään kymmenen mikrosatelliittigeenipaikan analysointia luotettavien tulosten saamiseksi. Tässä työssä ei ole näin ollen tuota testiä käytetty, vaan geneettisen pullonkaulan mahdollisuuden viitataan tapauksissa, joissa heterotsygotiaylijäämää selvästi esiintyy.

3.5. Yksilöiden välinen sukulaisuus

Parven yksilöiden välinen keskinäinen sukulaisuusaste, r -arvo, on laskettu käyttäen ohjelmaa Delrious (Stone & Björklund 2001). Ohjelma laskee mikrosatelliittiaineistosta jokaisen yksilöparin välisen sukulaisuuden, ja näistä pareittaisista arvoista on laskettu keskiarvo koko parvelle. Sukulaisuusasteen $r = 0,5$ vastaa täyssisaruksia, $r = 0,25$ puolissisaruksia ja $r = 0,125$ serkuksia. Kullekin emoparvelle on lisäksi laskettu täyssisarusparien osuus (niiden pareittaisten vertailujen osuus, joissa $r > 0,375$) ja sukulaisparien osuus ($r > 0,07$) kaikista pareittaisista vertailuista. Sukulaisuuden tilastollisena raja-arvona on siis käytetty r -arvoa $0,07$. Myös tämä menetelmä on sitä tarkempi, mitä suurempi analysoitu yksilömäärä ja geenipaikkojen määrä on. Mahdolliset poikkeamat Hardy-Weinbergin tasapainosta vaikuttavat r -arvoihin (menetelmä edellyttää satunnaista paritumista), joten niiden parvien osalta, joissa poikkeamia havaittiin, tulee r -arvoja tarkastella viitteellisinä. Tässä selvityksessä r -arvoja tulee kaikkien parvien osalta käyttää lähinnä vertailtaessa emoparvia keskenään.

Emokalaparvien sisäinen sukulaisuus on luokiteltu seuraavasti

Sukulaisuusaste (r)	Täyssisaria (%)	Sukulaisten osuus (%)	Luokittelu
<0.06		<20	erittäin alhainen
0.061-0.070	<5	20.1-25	alhainen
0.071-0.100	5.1-10	25.1-30	keskimääräinen
0.101-0.110	10.1-15	30.1-35	korkea
>0.111	>15.1	>35.1	erittäin korkea

3.6. Kantojen väliset erot

Kantojen välisten erojen analyysi perustuu eroihin geenimuotojen taajuuksissa sekä määrissä. F_{ST} -arvo kertoo kantojen välisen erilaisuuden, eli montako prosenttia kokonaismuuntelusta esiintyy kantojen välillä verrattuna kantojen sisäiseen geneettiseen muunteluun (esim. $F_{ST} = 0,0529$ tarkoittaa sitä, että 5,29 % muuntelusta esiintyy kantojen välillä ja loput kantojen sisällä). Mitä suurempi F_{ST} -arvo on, sitä erilaistuneempia kannat ovat. F_{ST} -arvon tilastollinen merkitsevyys kertoo sen, onko arvo suurempi kuin nolla. Mikäli arvo ei ole tilastollisesti merkitsevä, kannat eivät ole geneettisesti erilaistuneita.

Geenimuotojen taajuuksiin perustuva testi (population differentiation test) kertoo onko kantojen välillä eroja geenimuotojen taajuuksissa, ja F_{ST} -arvo puolestaan kertoo erojen suuruuden (montako prosenttia kokonaismuuntelusta esiintyy kantojen välillä, verrattuna kantojen sisäiseen muunteluun). Geenimuotojen taajuuksiin perustuva testi on konservatiivisempi kuin pelkkä F_{ST} -arvo.

F_{IS} -arvo puolestaan kuvaa kannan (tai parven) sisäistä geneettistä rakennetta. Mikäli tämä arvo on positiivinen kaikkien tutkittujen geenipaikkojen osalta, on todennäköistä että kannassa esiintyy sukusiitosta.

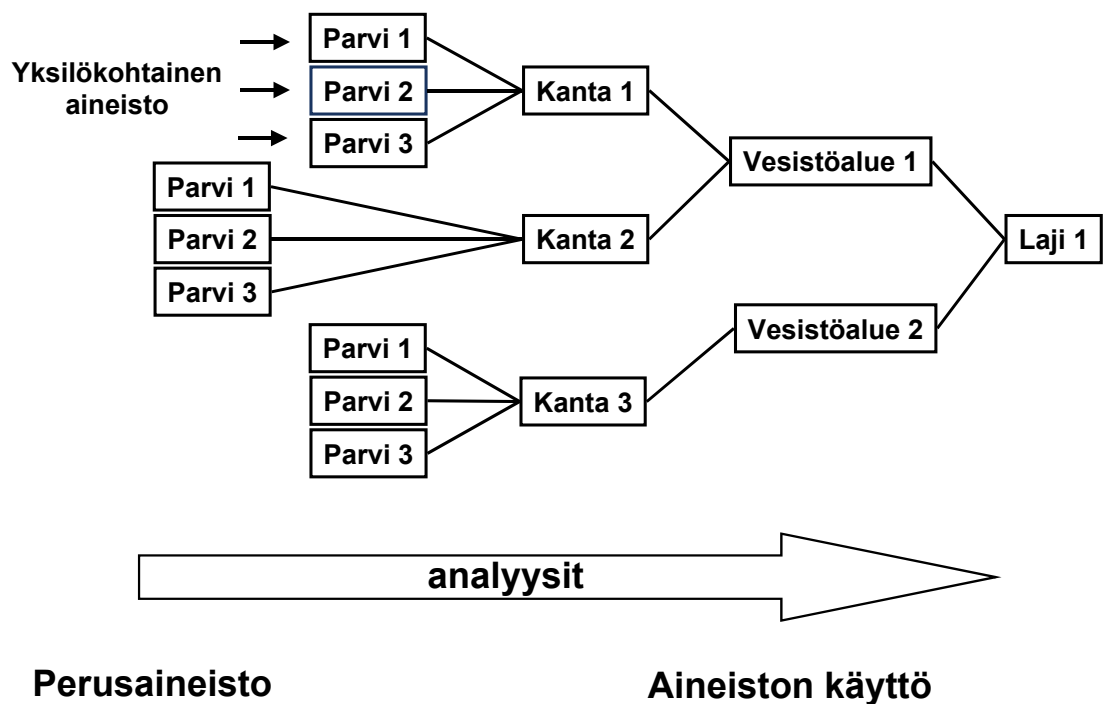
3.7. Kantojen väliset geneettiset etäisyydet

Kantojen väliset geneettiset etäisyydet on laskettu käyttämällä Nei DA distance –menetelmää. 'Puudiagrammi' kertoo eri kantojen suhteellisen geneettisen etäisyyden toisistaan. Mitä lähemmäs toisiaan kannat sijoittuvat, sitä läheisempää 'sukua' ne ovat toisilleen. Jokaisen viivan alussa oleva numero kertoo prosentuaalisesti kuinka todennäköistä on, että kanta sijoittuu juuri kyseiseen kohtaan. Mikäli luku on yli 50, tarkoittaa se yli 50%:n todennäköisyyttä, ja sijoittumista voidaan pitää melko varmana. Viivojen pituudet ovat puolestaan geneettisen erilaisuuden mitta: mitä pidempi viiva, sitä enemmän kanta poikkeaa muista kannoista.

4. Tarkastelutapa

Aineiston luonteen huomioiden sitä on tarkasteltu neljällä eri tasolla:

- Kalakohtaiset tiedot on ensin koottu parvitasolla laskemalla kunkin parven monimuotoisuustaso, efektiivinen koko ja yksilöiden välinen sukulaisuusaste. Saman kannan eri parvia on sitten verrattu keskenään mahdollisten geneettisten erojen selvittämiseksi.
- Tämän jälkeen parvikohtaiset tiedot on yhdistetty ja käsitelty kantatasolla laskemalla kantojen monimuotoisuustaso. Kannat on tämän jälkeen ryhmitelty vesistökohtaisesti (Inarinjärven, Pohjanlahden, Kuusamon, Rautalammin, ja Vuoksen alue)
- Kunkin vesistöalueen sisällä kantoja on verrattu keskenään ja niiden geneettiset erot on testattu.
- Neljännellä, eli lajitasolla, kaikkia kantoja on vertailtu keskenään ja niiden välisiä suhteita tarkastellaan esimerkiksi kantojen välisten geneettisten etäisyyksien avulla.



Kuva 1. Harjuksen emokalastojen geneettisen selvityksen tarkastelutavan hierarkkinen rakenne.

5. Tulokset

5.1 Harjusparvien erot ja geneettinen etäisyys

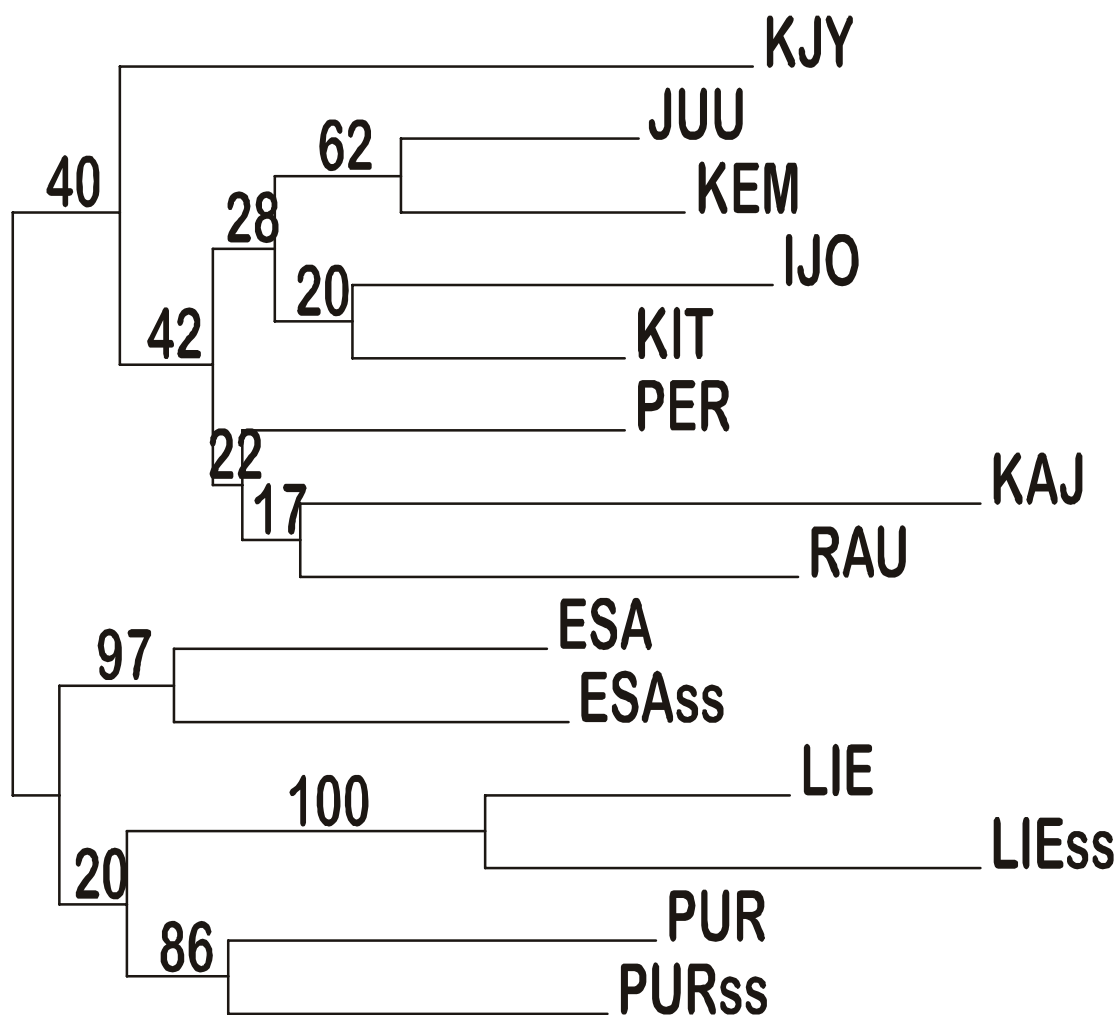
Kalanviljelylaitoksilla emokalaparvet elävät rajallisen ajan. Parven perustajayksilöiden määrä ja kasvatuksen aikana tapahtuva kuolevuus ovat sattumanvaraisia ja erillään luonnon- ja viljelypopulaatioista. Tästä syystä ei yksittäisen parven perusteella ole syytä tehdä pitkälle vieviä johtopäätöksiä.

Tutkitut emoparvet ja luonnonpopulaatioiden näytteet jakautuvat melko selkeästi kahteen maantieteelliseen alueeseen: Etelä-Suomi; Vuoksen vesistö (Etelä-Saimaan, Purveden ja Lieksanjoen harjukset) sekä muu Suomi (Rautalammin reitin, Kajaaninjoen, Kitkajoen, Kitkajärven, Kemijoen, Iijoen, Juutuanjoen harjukset). Lieksanjoen harjuksen emoparvet sekä luonnonpopulaatio ryhmittyvät selkeästi omaksi haarakseen Vuoksen vesistön sisällä.

5.2. Harjuskantojen erot ja geneettinen etäisyys

Useista saman kannan emokalaparvista tehdyistä mikrosatelliitti-DNA-analyyseistä voidaan yhdistämällä saada hyvä kuva kyseisen harjuskannan sijoittumisesta harjusten sukupuuhun Suomessa. 'Puudiagrammi' kertoo eri harjuskantojen suhteellisen geneettisen etäisyyden toisistaan. Mitä lähemmäs kannat sijoittuvat toisiaan, sitä läheisempää 'sukua' ne keskenään ovat. Jokaisen viivan alussa oleva numero kertoo prosentuaalisesti kuinka todennäköistä on, että kanta sijoittuu juuri kyseiseen kohtaan. Mikäli luku on yli 50, tarkoittaa se yli 50%:n todennäköisyyttä, ja sijoittumista voidaan pitää melko varmana. Viivojen pituudet ovat puolestaan geneettisen erilaisuuden mitta: mitä pidempi viiva, sitä enemmän kanta poikkeaa muista parvista.

Nei DA distance



Kuva 2. Harjuskantojen geneettiset etäisyydet.

Tutkittujen harjuskantojen ryhmittymisen ei muutu parvittaisesta ryhmittymisestä, vaikka saman kannan emokalastot yhdistetäänkin (Puruvesi, Lieksanjoki ja Rautalammin reitti). Kannat jakautuvat selkeästi kahteen maantieteelliseen alueeseen: Vuoksen vesistöön ja muuhun Suomeen. Kantojen väliset erot vaikuttavat selkeiltä.

5.3. Harjusparvien geneettinen monimuotoisuus

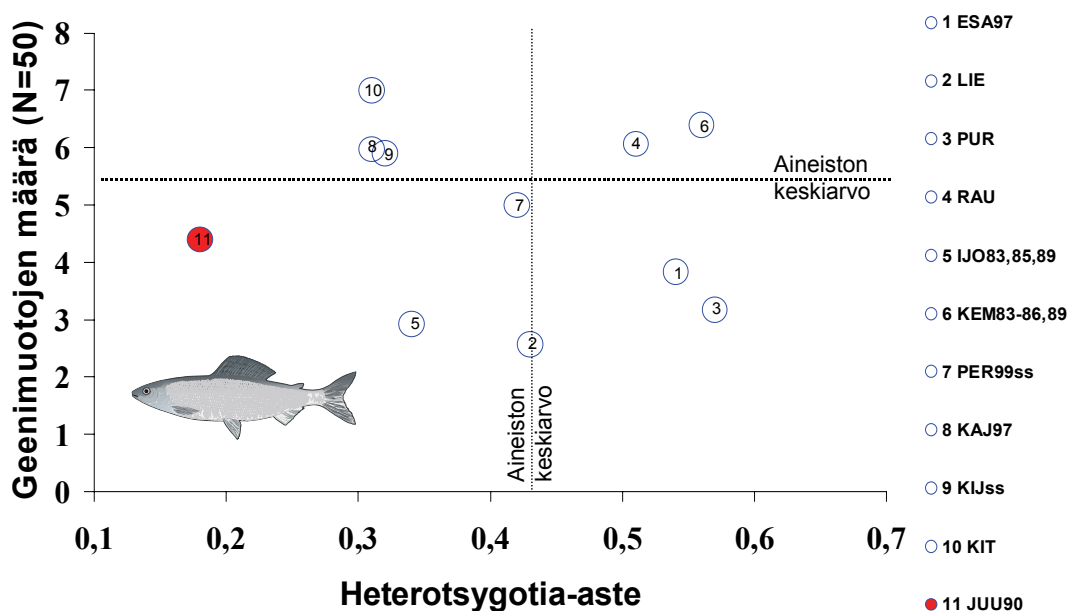
Yksittäisten emokalaparvien näytteistä ei voida tehdä johtopäätöksiä kannan tilasta luonnossa sen paremmin kuin koko viljelypopulaatiossakaan, elleivät kaikki viljelyssä olevat kalat ole samoista perustajayksilöistä peräisin. Mikäli näyteparvi on ikääntynyt ja määrällisesti pieni, ongelma tässä suhteessa korostuu. Parvikohtainen alleelien (geenipaikkojen) määrä ja heterotsygotia-aste kertoo kuitenkin, mihin asioihin viljelyssä erityisesti olisi kiinnitettävä huomiota.

Parvikohtaisessa aineostossa oli merkillepantavaa, että erityisesti Vuoksen vesistön ja Iijoen harjuskantojen geenidiversiteetti eli geenimuotojen (alleelien) määrä on selvästi muita harjuskantoja alhaisemmalla tasolla. Kuitenkaan tutkittujen emoparvien ja luon-

nosta saatujen vastaavien kantojen välillä ei ollut suuria eroja alleelimäärissä. Lisäksi Lieksanjoen, Puruveden ja Rautalammin reitin eri emoparvien välillä on havaittavissa selviä eroja heterotsygotia-asteessa, vaikka geenidiversiteetin erot ovatkin vähäisiä. Useimmista parvissa heterotsygotia-aste vastaa kohtuullisen hyvin geenimuotojen määrää.

5.4. Harjuskantojen geneettinen monimuotoisuus

Useista saman kannan emokalaparvista tehdyistä mikrosatelliitti-DNA -analyysistä voidaan yhdistämällä saada kohtalaisen hyvä kuva kyseisen kannan perinnöllisestä monimuotoisuudesta. Kuvassa 3. on esitetty jokainen harjuskanta pallona, jonka koordinaatit ovat kaikkien geenipaikkojen yli laskettu keskimääräinen havaittu heterotsygotia-aste ja geenimuotojen määrä, joka on korjattu vastaamaan näytekokoja 50. Tämä on siis analysoitujen kalojen määrästä riippumaton geenimuotojen määrä. Katkoviivalle on kuvaan merkitty kaikkien analysoitujen kantojen keskiarvot.



Kuva 3. Harjuskantojen geneettinen monimuotoisuus. Juutuanjoen harjuskannan (11) alhainen heterotsygotia-aste poikkeaa selvästi.

Kantojen välillä on huomattavia eroja monimuotoisuusasteessa. Vuoksen vesistön harjuksilla sekä Iijoen harjuksella on selvästi vähemmän geenimuotoja kuin muilla tutkituilla kannoilla. Etelä-Saimaan, Lieksanjoen ja Puruveden harjuksen luonnosta saaduilla emoilla (perustajayksilöillä) on jonkin verran enemmän geenimuotoja kuin vastaavien kantojen emokalastoissa, mutta erot eivät ole suuria. Tätä voidaan pitää osoituksena siitä, että Vuoksen vesistön harjusten muuntelun taso on luontaisestikin muita kantoja vähäisempää. Toisaalta taas Vuoksen vesistön harjusten emoparvien heterotsygotia-aste on keskiarvoa korkeampi.

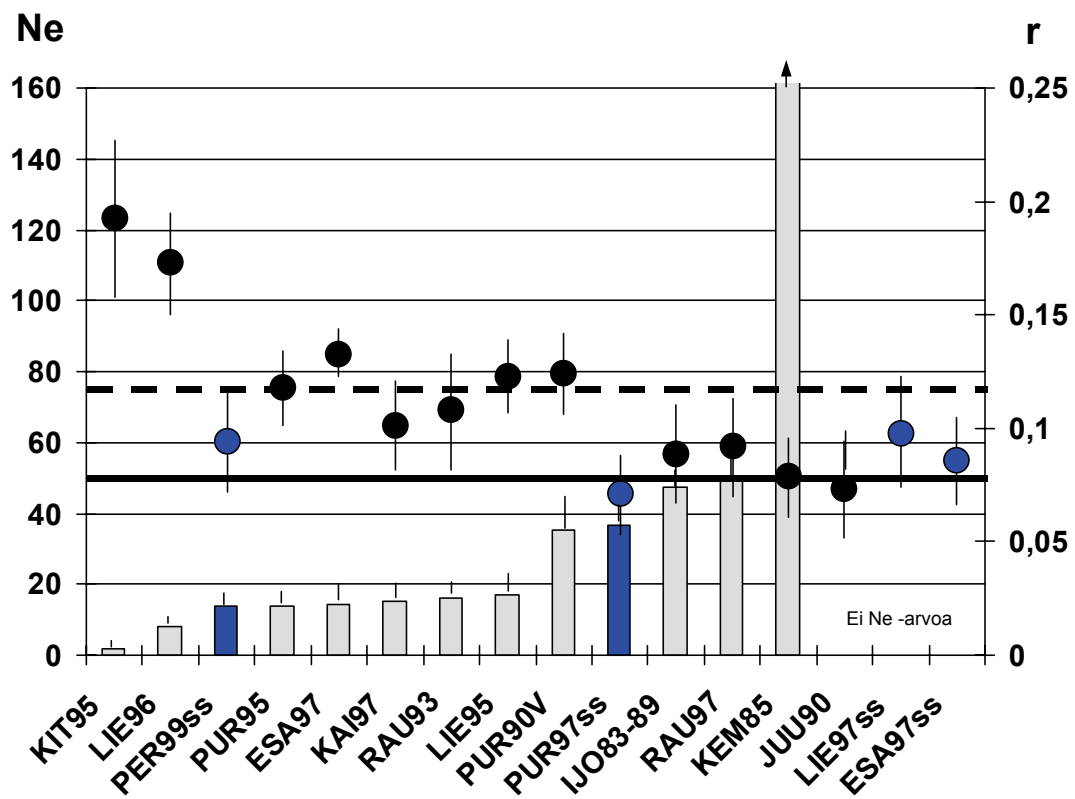
5.5. Harjusparvien sukulaisuusaste ja efektiivinen populaatiokoko

Tutkittujen harjusparvien määrät tutkittujen yksilöiden sukulaisuuden suhteen on esitetty seuraavassa:

Luokittelu	Sukulaisuusaste		Täyssisaria		Sukulaisten osuus	
	r-arvo	parvia	%	parvia	%	parvia
erittäin alhainen	<0.06	0			<20	1
alhainen	0.061-0.070	0	<5	1	20.1-25	0
keskimääräinen	0.071-0.100	8	5.1-10	7	25.1-30	5
korkea	0.101-0.110	2	10.1-15	6	30.1-35	5
erittäin korkea	>0.111	6	>15.1	2	>35.1	5

Kuvassa 4 on esitetty parvien toteutunut efektiivinen populaatiokoko (N_e) pylväsdiaagrammina (vasemmanpuoleinen akseli) 95%:n luottamusväleineen. Parvet on järjestetty efektiivisen koon mukaan pienimmästä suurimpaan. Tämä metodi on sitä tarkempi, mitä suurempi analysoitu yksilömäärä on, joten esimerkiksi noin 20 yksilön otoksiin on suhtauduttava varauksella.

Parven yksilöiden välinen keskinäinen sukulaisuusaste, r -arvo, (keskiarvo kaikista pareittaisista vertailuista) on esitetty palloina, joihin on piirretty myös 95%:n luottamusvälit (oikeanpuoleinen akseli). Sukulaisuuden r -arvo 0,5 vastaa täyssisaruksia, 0,25 puolisisaruksia ja 0,125 serkuksia.



Kuva 4. Harjusparvien toteutunut efektiivinen populaatiokoko N_e (pylväät) ja keskimääräinen yksilöiden välinen sukulaisuusaste r (pallot). Katkoviivalla on merkitty sukulaisuusasteen yleiskeskisarvo (0,115) ja yhtenäisellä viivalla efektiivisen koon suosituskoko ($N_e = 50$).

Toteutunut efektiivinen populaatiokoko (niiden perustajayksilöiden lukumäärä, joiden jälkeläisiä on parvessa edustettuna) on huomattavan alhainen usean parven osalta. Yli puolella (7) kaikista analysoiduista emoparvista (13) toteutunut efektiivinen perustajamäärä näyttäisi olevan alle 20 yksilöä. Ainoastaan kolmella parvella N_e oli yli 40 yksilöä, mutta kahdella niistä – IJO83-89 ja KEM85 tämä aiheutunee ainoastaan erikäisten emoparvien yhdistämisestä. HRPUR90V-parvi on taas tuotettu käyttäen ainakin kahta emoparvea (HRPUR86 ja HRPUR89), joista on lypsetty suurehko määrä yksilöitä. Näistä saatua mätiä on viety luonnonravintolammikkoon, mistä sitten osa on satunnaisesti valittu HRPUR90V -ikäluokkaan. Sukulaisuusasteen yleiskeskisarvo ($r=0,115$) on suhteellisen korkea, mutta perustajamääriin nähden kohtuullisella tasolla. Niissä parvissa, joiden perustajamäärä jäi alle 20, keskimääräinen sukulaisuusaste vaihteli erittäin paljon. Satunnaistekijät voivat vaikuttaa näihin tuloksiin ko. parvissa, mutta tulokset voivat olla myös seurausta vaihtelusta hedelmöitystuloksessa parvea perustettaessa (pariuttamistapa, perheiden lukumäärä) ja/tai myöhemmästä valikoivasta kuolleisuudesta.

Kantakoodin perään kirjoitettu numero kertoo kyseisen parven perustamisvuoden (kalojen kuoriutumivuosi). Mitä vanhempi parvi on, sitä enemmän yksilöitä on todennäköisesti kuollut, mikä osaltaan pienentää aineistosta laskettua efektiivistä perustajamäärää. Toisin sanoen, mitä nuoremasta parvesta on kysymys, sitä luotettavampi aineistosta laskettu efektiivinen koko on.

Toteutunutta efektiivistä populaatiokokoa ei pystytty laskemaan kaikista emokalastoista mm. monistumattomien näytteiden takia (HRKJY ja HRKITss) tai ohjelman antama arvo oli ääretön (HRJU90, HRLIE97ss ja HRES97ss).

Tämän parvikohtaisen analyysin perusteella näyttää siltä, että esimerkiksi simulointitutkimusta apuna käyttäen olisi tarpeen selvittää eri hedelmöitystapojen vaikutus mikrosatelliitein mitattavaan efektiiviseen populaatiokokoon. Näin olisi mahdollisuus selvittää esimerkiksi eri ikäluokkien yhdistämisen geneettiset vaikutukset.

6. Kantakohtainen tarkastelu ja suositukset

Seuraavissa kantakohtaisissa tarkasteluissa mukaan on otettu myös viljelykantarekisterissä (Makkonen ym. 2000) esitetty arvio kunkin kannan uhanalaisuudesta sekä viljelyn tarpeellisuudesta.

<p>HRESA97 Järviharjus Vuoksen vesistö, Kyläniemen eteläpuoli Ikäluokat –97 ja –97ss</p>	<p>TILANNE: Erillinen kanta, johon kuitenkin on sekoittunut jonkin verran Puruveden harjuskantaa. Parven efektiivinen koko pieni ja sukulaisuusaste korkea. Geenidiversiteetti tämän ikäluokan perustajayksilöissä on selvästi korkeampi kuin emoparvessa, eli emoparven perustamisen ja alkukasvatuksen aikana monimuotoisuus on vähentynyt. VILJELYKANTAREKISTERIN ARVIO: Viljely tarpeellinen, Silmälläpidettävä, puutteellisesti tunnettu kanta. SUOSITUS KÄYTÄNNÖKSI: On syytä perustaa useita peräkkäisiä emokalastoja ja pyrkiä vähentämään kasvatuksen alkuvaiheenkuolleisuutta. JATKOTUTKIMUSTEN TARVE:</p>
<p>HRPUR Järviharjus Vuoksen vesistö, Puruvesi Ikäluokat –90, –95 ja –98ss</p>	<p>TILANNE: Selvästi perinnöllisesti oma kantansa. Monimuotoisuusasteeltaan Vuoksen harjuskantojen yleistaso, tosin emoparvi heterotsygotia-aste vaihtelee keskiarvon molemmiin puolin. Luonnosta saaduissa harjuksissa jonkin verran enemmän geenimuotoja. Emokalastojen sukulaisuusaste korkea. VILJELYKANTAREKISTERIN ARVIO: Viljely tarpeellinen, Silmälläpidettävä, taantunut kanta. SUOSITUS KÄYTÄNNÖKSI: Useiden emoparvi-ikäluokkien perustaminen ja samanaikainen viljely tarpeen sukusiitoksen estämiseksi ja monimuotoisuuden varmistamiseksi. JATKOTUTKIMUSTEN TARVE:</p>
<p>HLRIE Jokiharjus Lieksanjoki Ikäluokka –97 ja –97ss</p>	<p>TILANNE: Selvästi oma erillinen kanta. Monimuotoisuustaso hieman Vuoksen harjusten keskitasoa alhaisempi, mutta parvien heterotsygotia-asteet vaihtelevat ikäluokittain. Geenimuotojen määrä oli myös luonnosta saaduilla harjuksilla samalla tasolla kuin emoparvissakin, mutta heterotsygotia-aste oli selvästi emoparvia alempi. Se voi aiheutua sattumasta. Emoparvissa on suositusta alhaisempi efektiivinen koko, ja niiden sukulaisuusasteet ovat varsin korkeat. VILJELYKANTAREKISTERIN ARVIO: Viljely tarpeellinen, silmälläpidettävä, harvinainen kanta. SUOSITUS KÄYTÄNNÖKSI: Pieni toteutunut efektiivinen koko sekä korkea sukulaisuus aiheuttavat sukusiitosta ja monimuotoisuuden alenemista. Useiden peräkkäisten emovuosisluokkien viljely on välttämätöntä. JATKOTUTKIMUSTEN TARVE:</p>
<p>HRRAU Järviharjus (Ylisenkoski) Ikäluokat-93 ja -97</p>	<p>TILANNE: Perinnöllisesti selvästi oma kantansa. Monimuotoisuusaste suhteellisen korkea muihin harjuskantoihin verrattuna. Kuitenkin parvissa merkkejä sukusiitoksesta ja /tai perustajien pienestä määrästä tai kannan sekoittumisesta. VILJELYKANTAREKISTERIN ARVIO: Viljely tarpeellinen, ei uhanalainen, ilmeisesti siirretty kanta, joka on peräisin Laa-</p>

	<p>tokan ja Kemijoen harjuskantojen istutuksista.</p> <p>SUOSITUS KÄYTÄNNÖKSI: Useiden peräkkäisten emovuosisiluokkien viljely on välttämätöntä.</p> <p>JATKOTUTKIMUSTEN TARVE: Luonnonkannan monimuotoisuutta tulisi verrata laitoskalastoihin, koska merkkejä mahdollisesta sukusiitoksesta löytyi.</p>
<p>HRKAJ (HROUV) Jokiharjus Kajaaninjoki Ikäluokka -97</p>	<p>TILANNE: Poikkeaa muista harjuskannoista perinnöllisesti. Suhteellisen paljon geenimuotoja, mutta heterotsygotia-aste selvästi keskiarvoa alempi. Pieni efektiivinen koko ja erittäin suuri sukulaisuusaste (suurin sukulaisten osuus kaikista tutkituista parvista). Merkkejä sukusiitoksesta.</p> <p>VILJELYKANTAREKISTERIN ARVIO: Viljely tarpeellinen, silmälläpidettävä, harvinainen kanta. Nykyinen Oulujoen vesistön kanta on lähtöisin Kajaaninjoen harjuksista.</p> <p>SUOSITUS KÄYTÄNNÖKSI: Perustettava uusia emokalastoja luonnosta.</p> <p>JATKOTUTKIMUSTEN TARVE: Luonnonkannan perinnölliset ominaisuudet olisi selvitettävä.</p>
<p>HRKIJ Jokiharjus Kitkajoki Ikäluokka</p>	<p>TILANNE: Näytteet eivät toimineet, joten tarkempia johtopäätöksiä ei voida esittää.</p> <p>VILJELYKANTAREKISTERIN ARVIO: Viljely tarpeellinen, ei uhanalainen, alkuperäinen kanta.</p> <p>SUOSITUS KÄYTÄNNÖKSI:</p> <p>JATKOTUTKIMUSTEN TARVE: Otettava uudet näytteet, jotta analyysit voidaan varmistaa.</p>
<p>HRKIT Järviharjus Kitkajärvi Ikäluokat: 90-93ss, ja 95</p>	<p>TILANNE: Selvästi oma erillinen kanta. Osa näytteistä ei toiminut, joten johtopäätöksiin suhtauduttava varovasti. Geenimuotojen määrä korkea muihin harjuksiin verrattuna. Luonnonkaloissa oli ainakin 4 geenimuotoa, joita ei löytynyt niistä v. 1995 perustetussa jälkeläistössä. Kyse on perustamisotantaan liittyvästä heikkoudesta tai valikoivasta kuolevuudesta viljelyssä, koska perustajamäärä oli 173, mutta toteutunut efektiivinen koko v. 95-parvessa oli kuitenkin vain 1,7.</p> <p>VILJELYKANTAREKISTERIN ARVIO: Viljely välttämätön, vaarantunut, alkuperäinen kanta.</p> <p>SUOSITUS KÄYTÄNNÖKSI: Uusien parvien perustamista on jatkettava luonnonkaloista, mutta on pidettävä huoli siitä, että mahdollisimman monen perustamisessa käytetyn perheen jälkeläisiä saadaan emokalastoon.</p> <p>JATKOTUTKIMUSTEN TARVE:</p>
<p>HRPERss Meriharjus Perämeri, Krunnit Ikäluokka: 99 saaliskalat</p>	<p>TILANNE: Selvästi oma erillinen kanta. Monimuotoisuustaso suhteellisen korkea. Merkkejä sukusiitoksesta ja mahdollisesta sekoittumisesta. Kyseessä luonnonkalanäyte, josta ei kuitenkaan voitu perustaa emokalastoa.</p> <p>VILJELYKANTAREKISTERIN ARVIO: Viljely välttämätön, erittäin uhanalainen, alkuperäinen kanta</p> <p>SUOSITUS KÄYTÄNNÖKSI:</p> <p>JATKOTUTKIMUSTEN TARVE:</p>
<p>HRIJO Jokiharjus Iijoki Ikäluokat: -83, -85 ja -</p>	<p>TILANNE: Perinnöllisesti erillinen kanta, mutta monimuotoisuusaste alhainen verrattuna muihin harjuksiin (Vuoksen vesistön harjuksia lukuun ottamatta). Usean vuosiluokan yhdistettyä näytteestä (jo useamman sukupolven laitoskalastoja) lasketut</p>

89, yhdistetty parvi	<p>toteutuneet efektiiviset koot ja sukulaisuusarvot ovat todennäköisesti korkeampia kuin erillisistä ikäluokista lasketut.</p> <p>VILJELYKANTAREKISTERIN ARVIO: Viljely tarpeellinen, ei uhanalainen, alkuperäinen kanta.</p> <p>SUOSITUS KÄYTÄNNÖKSI: Emoparvien uusiminen luonnosta saatavista kaloista tarpeen peräkkäisinä vuosina, jotta sukusiitosta voidaan välttää ja hallita tuotantoa tarkemmin.</p> <p>JATKOTUTKIMUSTEN TARVE: Luonnonkalojen perinnöllinen muuntelu olisi selvitettävä, koska monimuotoisuusaste on muihin saman alueen harjuksiin verrattuna selvästi alhaisempi.</p>
<p>HRKEM Jokiharjus Kemijoki Ikäluokat -83,-84,-85,-86 ja -89 yhdistetty</p>	<p>TILANNE: Perinnöllisesti muista harjuksista eriytynyt kanta. Kyseessä usean vuosiluokan yhdistelmäparvi, joten em. Iijoen harjasta koskevat seikat pätevät myös tässä. Monimuotoisuusaste suhteellisen korkea (sekä geenimuotojen määrä että heterotsygotia-aste). Korkea toteutunut efektiivinen koko selittyy parvien yhdistämisellä, samoin suhteellisen alhainen sukulaisuusaste. Näistä huolimatta parvessa selviä merkkejä sukusiitoksesta.</p> <p>VILJELYKANTAREKISTERIN ARVIO: Viljely tarpeellinen, ei uhanalainen, alkuperäinen kanta.</p> <p>SUOSITUS KÄYTÄNNÖKSI: Luonnosta 1983-86 saaduista kaloista olisi perustettava mahdollisimman laaja emokalasto pareittaisilla hedelmöityksillä jälkeläismäärä tasaten. Emokalaston jatkuva uusiminen luonnosta suositeltavaa.</p> <p>JATKOTUTKIMUSTEN TARVE:</p>
<p>HRJUJ Jokiharjus Juutuanjoki Ikäluokka: -90</p>	<p>TILANNE: Selvästi oma erillinen kanta. Erittäin alhainen heterotsygotiaste sekä kahden geenipaikan erittäin selvä heterotsygotia-alijäämä viittaavat pieneen perustajamäärään ja sukusiitokseen. Koska perustamisessa oli kuitenkin käytetty runsaasti emokaloja (168 emoa), kyse on todennäköisesti perustamista-pahtumiin liittyvästä otantavirheestä tai valikoivasta kuolevuudesta viljelyssä, eli jälkeläistöön on saatu vain osa käytettyjen emojen monimuotoisuutta.</p> <p>SUOSITUS KÄYTÄNNÖKSI: Parvien uusiminen luonnonkaloista tarpeen.</p> <p>VILJELYKANTAREKISTERIN ARVIO: Viljely tarpeellinen, ei uhanalainen, alkuperäinen kanta</p> <p>JATKOTUTKIMUSTEN TARVE:</p>

Kirjallisuus

- Aho, T. 1999: Mikrosatelliitti-DNA tutkimustekniikkana. RKTL, Kala- ja riistaraportteja 147:12-16
- Aho, T., Piironen, J. ja Pursiainen, M. 2002: Avain viljeltävien taimen-, harjus- ja sii-kaemokalastojen geneettiseen tietokantaan Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen vesiviljelyssä. RKTL, Kala- ja riistaraportteja 253: 1-23 + liitt.
- Ewens, W. J. 1972: The sampling theory of selective neutral alleles. *Theoretical Population Biology* 3: 87-112.
- Hill, W.G. 1981: Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genet. Res.* 38: 209-216.
- Makkonen, J., Westman, K., Pursiainen, M., Heinimaa, P., Eskelinen, U., Pasanen, P. ja Kumm, P. 2000: Viljelykantarekisteri, Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen kalanviljelylaitoksissa ja maitipankissa säilytyksessä olevat kalalajit ja –kannat. Kala- ja riistaraportteja nro 200:
- Stone, J. & Björklund, M. 2001: DELRIOUS: a computer program designed to analyse molecular marker data and calculate delta and relatedness estimates with confidence. *Molecular Ecology Notes* 1: 209-212.

LIITE

Tutkituissa harjusparvissa (lyhenteet samat kuin sivulla 7) eri mikrosatelliittilokuksissa havaittu alleelimäärä lokuksittain. Yksilömäärä korjattu laskennallisesti 50:ksi.

<i>Lokus</i>	<i>Cocl23</i>	<i>FGT1</i>	<i>MST73</i>	<i>MST85</i>	<i>BFRO18</i>	<i>Ogo2</i>	<i>Thy-A-181</i>
parvi							
ESA97	5,9	-	1,9	1,9	3,8	2,9	3,8
ESA97ss	6,3	-	2,2	3,4	5,9	5,9	4,6
PUR90V	5,3	-	2,1	3,3	3,3	4,6	4,4
PUR95	5,5	-	2,1	3,2	3,2	5,6	4,3
PUR98ss	4,9	-	2,3	3,5	4,9	6,2	4,9
LIE95	3,1	-	3,1	2,1	4,2	4,2	3,1
LIE96	3,3	-	3,2	2,1	4,8	2,1	3,5
LIE97ss	3,5	-	3,5	2,1	4,8	2,1	3,5
RAU93	5,9	8,3	4,6	8,4	-	-	-
RAU97	5,9	9,1	4,6	7,1	-	-	-
KAJ97	6,7	6,8	2,1	9,1	-	-	-
KIT95	9,8	5	4,4	3,3	-	-	-
KIT90ss	-	-	5,4	3,7	-	-	-
KIJss	4,7	-	7,8	5,2	-	-	-
IJO83,85,89	3,4	7,1	2,1	3,3	-	6,7	-
KEM83-86,89	8,0	5,8	4,1	7,1	-	-	-
PER99ss	7,4	11,9	4,4	3,2	-	-	-
JUU90	9,0	14,6	2,1	2,1	-	-	-
Alleeleja yhteensä	11	22	8	13	8	11	5
keskiarvo	5,80	8,58	3,44	4,12	4,16	4,60	3,98

- = lokus ole toiminut tai sitä ei ole määritetty