

KALA- JA RIISTARAPORTTEJA nro 253

*Teija Aho
Jorma Piironen
Markku Pursiainen*

Avain viljeltävien taimen-, harjus- ja
siikaemokalastojen geneettiseen tietokantaan Riista- ja
kalatalouden tutkimuslaitoksen vesiviljelyssä

Helsinki 2002

Teija Aho, Jorma Piironen ja Markku Pursiainen

Avain viljeltävien taimen-, harjus- ja siikaemokalastojen geneettiseen tietokantaan Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen vesiviljelyssäRiista- ja kalatalouden tutkimuslaitos
Vesiviljely

503024/DNARAP

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen vesiviljelyn tulosyksikkö on viime vuosina yhteistyössä Helsingin yliopiston Ekologian ja systematiikan laitoksen Populaatiobiologian osaston tutkijaryhmän kanssa selvittänyt DNA-mikrosatelliittitekniikan avulla viljelyssä olevien emokalastojen perinnöllistä monimuotoisuutta ja kantojen sisäisiä ja välisiä perinnöllisiä eroja. Laajassa työssä on syntynyt paljon viljelyssä ja kalavesien hoidossa käyttökelpoista tietoa kantojen tilasta ja säilyttämisen edellytyksistä. Kerättyä tietoutta hyödynnetään toiminnassa ja myös täydennetään sähköisessä muodossa tallennetun tietokannan avulla, mutta osia siitä julkaistaan myös perinteisessä paperisessa muodossa. Tässä kirjoituksessa tarkastellaan viljelysäilytyksessä olevien kalalajien ja –kantojen geneettisen tietokannan perusteita ja rakennetta sekä viljelyssä käytettäviä menettelytapoja perinnöllisen monimuotoisuuden turvaamiseksi. Koska vesiviljelyn merkitys kantojen säilyttämisessä perimältään mahdollisimman laajoina on suuri, kirjoitukseen on sisällytetty myös termistöä ja käytettyjen mittaristojen esittelyä. Raportti on ensimmäinen sarjassa, jonka seuraavat osat tulevat käsittämään omina niteinään viljelyssä olevien taimenkantojen, harjusten ja siikakantojen emokalastojen vuosituhannen vaihteen molemmin puolin tehtyjen mikrosatelliitti-DNA –kartoitusten tulokset.

perinnöllinen monimuotoisuus, mikrosatelliitti-DNA, emokalanviljely, viljelymenetelmät, geneettinen tietokanta

Kala- ja riistaraportteja 253

951-776-369-7

1238-3325

23 s. + 2 liitettä

suomi

-

julkinen

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos
Vesiviljely
PL 6
00271 HELSINKI
Puh. 0205 7511 Fax 0205 7512 01Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos
PL 6
00271 HELSINKI
Puh. 0205 7511 Faksi 0205 7512 01

Sisällys

ESIPUHE.....	1
1. JOHDANTO.....	3
2. EMOKALASTOJEN GENEETTISEN TIETOKANNAN PERUSTEET JA RAKENNE	4
2.1. Mikrosatelliitti-DNA: mitä se on	4
2.1.1. Mikrosatelliittigeeni	4
2.1.2. Pienet näytteet riittävät.....	5
2.2. Mitä mikrosatelliitit voivat kaloista kertoa?.....	6
2.3. Mikrosatelliitit ja muut perimän tutkimismenetelmät	7
2.3.1. Mikrosatelliitit verrattuna entsyymielektroforeesiin.....	7
2.3.2. Eri menetelmillä saatujen tietojen yhdistely	7
2.3.3. Mahdolliset uudet menetelmät	8
3. EMOKALASTOJEN GENEETTISEN TIETOKANNAN MITTARISTO.....	9
3.1. Monimuotoisuus.....	9
3.1.1. Havaittu geenimuotojen määrä.....	9
3.1.2. Heterotsygotia-aste, havaittu ja odotettu	9
3.2. Efektiivinen populaatiokoko	9
3.2.1. Perustajajaksilöt	9
3.2.2. Teoreettinen efektiivinen populaatiokoko (N_e).....	9
3.2.3. Toteutunut efektiivinen populaatiokoko	10
3.3. Geneettinen pullonkaula.....	11
3.4. Yksilöiden välinen sukulaisuus	11
3.5. Kantojen väliset erot	12
3.6. Kantojen väliset geneettiset etäisyydet	12
4. EMOKALOJEN VILJELYN MENETTELYTAVAT JA GENEETTINEN MONIMUOTOISUUS..	14
4.1. Hedelmöitysmenettelyt.....	14
4.2. Emoparven mitoitus.....	15
4.3. Yksi vai useita emoparvia?.....	16
4.4. Emoparvien tuottaman mädin käyttö istukastuotannossa.....	18
4.5. Emokalastojen uusiminen laitosemoista	18
5. KÄYTÄNNÖN SOVELLUTUKSIA.....	19
5.1. Mädin ja maidin lyhykestoinen säilytys.....	19
5.2. Emoparvien perustamishedelmöitykset.....	20
5.2.1. Petomaiset lohikalat.....	20
5.2.2. Siiat.....	20
5.2.3. Harjus	21
KIITOKSET	22
KIRJALLISUUS	23

Liite 1. Genetiikan termistöä

Liite 2. Aiheeseen liittyvä keskeinen kirjallisuus

Esipuhe

Maamme kalasto on kehityshistoriallisesti nuorta koska kalat pääsivät levittäytymään Suomeen vasta mannerjään vetäytymisen myötä. Maan kohoamisen seurauksena vesien virtaussuunnat ovat muuttuneet ja vedenjakajat ja muut maantieteelliset esteet ovat erottaneet eri kalakannat toisistaan. Samasta lajista on kehittynyt kuluneiden tuhansien vuosien aikana levinneisyysalueen eri osissa vallitseviin olosuhteisiin sopeutuneet kalakannat. Tämä on jättänyt jälkensä perintötekijöihin ja historiallisesti samaa alkuperääkin olevat eri vesistöjen kalakannat eroavat geneettisesti toisistaan.

Kalastomme on jo pitkään kärsinyt elinympäristön muuttumisesta, liiallisesta ja/tai valikoivasta kalastuksesta sekä suunnittelemattomista istutuksista joissa mm. poikasten alkuperää ei ole otettu huomioon. Muutokset ovat voimakkaimmin kohdistuneet kalastomme arvokkaimpaan osaan, virtaavissa vesissä lisääntyviin lohiin, taimeniin, harjukseen ja siikoihin sekä järvissä kutevaan nieriään. Monet erilaistuneet kannat on kokonaan menetetty ja jäljellä olevat ovat pääosin taantuneita ja uhanalaisia niiden luonnonvaraisen lisääntymisen vaarannuttua tai käytyä mahdottomaksi.

Kalastomme jatkuva köyhtyminen on johtanut lisääntyvään tarpeeseen turvata vielä jäljellä olevien uhanalaisten lajien ja kantojen säilyminen viljelyn avulla. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen (RKTL) hoitaman valtion kalanviljelyn keskeisin tehtävä on kansainvälisten ja kansallisten velvoitteiden ja sopimusten mukaisesti turvata taloudellisesti arvokkaiden kalalajien ja -kantojen säilyminen viljelyn keinoin. Tähän kuuluu niiden ylläpito viljelylaitoksissa (elävät geenipankit), perinnöllisen aineksen säilytys maitipankissa, taantuneiden kantojen elvytysistutukset ja kotiutus uusiin elinympäristöihin sekä korkealaatuisen mädin tuotanto myös yksityiselle viljelylle istutuspoikasten kasvatusta varten.

RKTL:n kalanviljelylaitokseen on tallennettu kaikki kalataloudellisesti arvokkaimmat kalakantamme; 12 alkuperäistä kalalajia ja muotoa ja näistä lähes 70 eri kantaa. Maitipankissa on lisäksi 10 lajia ja 35 kantaa.

Vesiviljelyn tulosityksikön toimesta on äskettäin koottu viljelykantarekisteriin yhtenäiseen muotoon tiedot tutkimuslaitoksen viljelylaitoksissa ja maitipankissa säilytyksessä olevista kalalajeista ja -kannoista, niiden taustoista, tilasta ja monimuotoisuudesta (RKTL, Kala- ja riistaraportteja nro 200).

Viljelyssä olevien kalakantojen perinnöllisen monimuotoisuuden säilyminen on toiminnan perusta ja kantojen luonnonmukaiseen kiertokulkuun palauttamisen ja elvyttämisen edellytys. Vesiviljelyn tulosityksikkö onkin 1990-luvulta lähtien ollut mukana ja tukemassa emokalastojen perinnöllisen tilan, kantojen välisten erojen ja monimuotoisuuden selvittämistä koskevaa tutkimustyötä. Tavoitteena on tutkimustuloksiin nojautuen pyrkiä saamaan viljelykantojen monimuotoisuus vastaamaan mahdollisimman paljon luonnonkannoissa vielä tavattavaa monimuotoisuutta. Yhteistyösapuolina ovat olleet paitsi tutkimuslaitoksen kalantutkimusyksiköt, myös erityisesti Helsingin yliopiston Ekologian ja systematiikan laitoksen Populaatiobiologian osastossa professori Esa Rannan johdolla toiminut tutkijaryhmä.

Laaja ja monipuolinen, paljon työtä, suunnittelua ja järjestelyjä kaikkien osapuolien kesken vaatinut viljelykantojen tilaa koskeva hanke on valmistumassa. Tutkimuksissa käytettyä ja hyödynnettyä mikrosatelliitti-DNA-tekniikkaa ovat työn aikana erityisesti kehittäneet akatemiaturkija Craig Primmer Helsingin yliopistosta ja FT Teija Aho, nyttemmin Uppsalan yliopistosta. Turkija Mikko Koskinen on yhdistänyt mikrosatelliitti-DNA-tekniikkaa mitokondrio-DNA -tekniikkaan harjuskantojen alkuperää koskevissa töissään. Erikoistutkija Jorma Piironen ja laitosjohtaja Markku Pursiainen ovat tutkimuslaitoksen osalta olleet keskeisessä asemassa hankkeen etenemiselle. Esitän kaikille edellämaituille parhaat kiitokset tuloksellisesta ja hyvin sujuneesta yhteistyöstä.

Tämä raportin tavoitteena on tarkastella viljelysäilytyksessä olevien kalakantojen geneettisen tietokannan perusteita ja rakennetta ja viljelyssä käytettäviä menettelytapoja monimuotoisuuden turvaamiseksi. Viljelyssä olevien taimenten, harjusten ja siikojen monimuotoisuutta tullaan käsittelemään erillisissä raporteissa. Näiden julkaisujen lisäksi viljelykantojen geneettistä rakennetta on jo käsitelty monissa tieteellisissä julkaisuissa jotka on mainittu tämän raportin kirjallisuusluettelossa. RKTL:n laitoksissa viljelyssä olevien lohikantojen monimuotoisuutta koskevat mikrosatelliitti-DNA-tutkimukset ovat myös käynnissä FT Marja-Liisa Koljosen toimesta.

Kai Westman

Vesiviljelyjohtaja

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 erilaisuus ja perinnöllinen monimuotoisuus. Koska emokalastoilla ja siten valtion kalanviljelyllä on tässä keskeinen rooli, päätettiin Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen vesiviljelyn tulosityksikössä 1990-luvulla ryhtyä kartoittamaan emokalastojen perinnöllistä tilaa, erilaisuutta ja monimuotoisuutta eli biodiversitteettiä. Toiminnalla on ollut ja tulee olemaan suuri vaikutus mm. vesiviljelyn laatujärjestelmän (sertifioitu ISO 9001-järjestelmä) menettelyohjeisiin. Tulokset ovat nyt valmistumassa taimenten, harjusten ja siikojen osalta (esim. Aho 2000, Aho 2001).

Tämän julkaisun tarkoituksena on selventää geneettisen tietokannan perusteita ja rakennetta, mittaristoa ja geneettistä monimuotoisuutta erityisesti RKTL:n vesiviljelyn omiin tarpeisiin mutta laajemminkin koko vesiviljelyn käyttöön monimuotoisuuden säilyttämiseksi emokalanviljelyssä. Aineistoa on käytetty jo tutkimuslaitoksen vesiviljelyn sisäisessä koulutuksessa. Lukemista helpottamaan on keskeisin käytetty termistö koottu ja kuvailtu kirjoituksen liitteeksi mukaillen pääasiassa Jugan ym. (1999) selityksiä ja siksi termejä ei ole tekstissä enemmälti selitetty. Liitteessä selitetyt termit on alleviivattu varsinaisessa tekstissä.

Tämä käsillä oleva kirjoitus on ensimmäinen sarjassa, jonka seuraavat osat tulevat käsittelemään omina niteinään viljelyssä olevien taimenkantojen, harjuskantojen ja siikakantojen emokalastojen mikrosatelliitti-DNA –selvitysten tulokset.

Tähän julkaisuun on otettu myös liitteeksi luettelo siitä keskeisimmästä kirjallisuudesta, mikä läheisesti sivuaa julkaisun sisältöä ja kalakantojen perimän tutkimustuloksia yleensä.

2. Emokalastojen geneettisen tietokannan perusteet ja rakenne

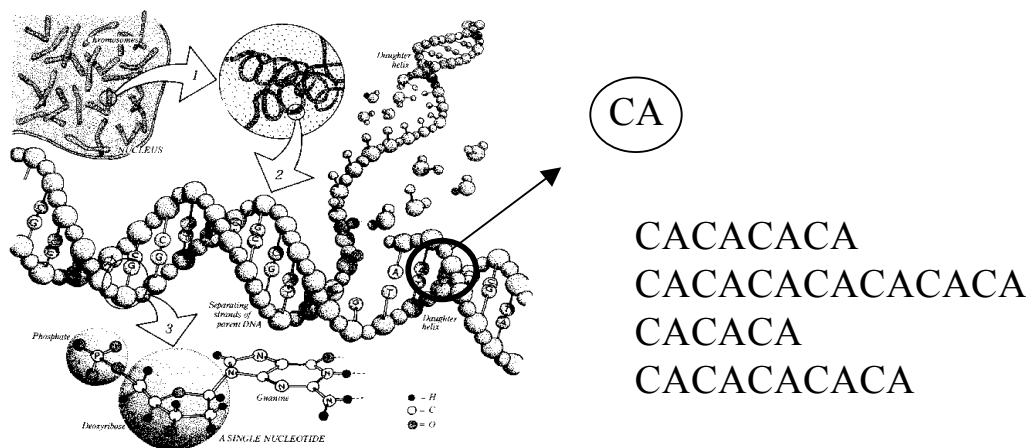
2.1. Mikrosatelliitti-DNA: mitä se on

2.1.1. Mikrosatelliittigeeni

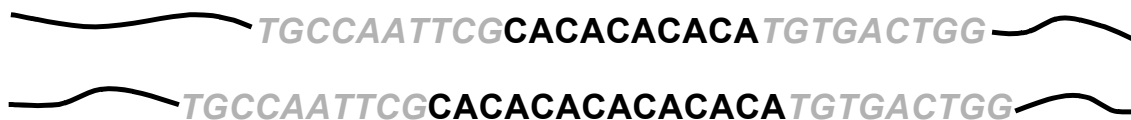
Mikrosatelliittigeenit ovat ns. ei-koodaavaa DNA:a, eli nämä geenit eivät säätele mitään yksilön ominaisuutta tai elintoimintoja. Ne ovat siis pelkästään merkkigeenejä, jotka kuvastavat kunkin yksilön kaikkien geenien monimuotoisuuden tasoa. Näin ollen ne ovat ns. neutraaleja geenejä, ja mikrosatelliittigeeneissä tapahtuvat mutaatiot säilyvät populaatiossa, koska niihin ei kohdistu luonnonvalintaa. Ominaisuuksia koodaavien geenien osalta luonnonvalinta karsii populaatioista haitallisesti vaikuttavia mutaatioita. Mikrosatelliittigeeneissä mutaatioita tapahtuu paljon, joten muuntelua on paljon, ja hyvin pienetkin geneettiset erot eri populaatioiden ja jopa saman kannan eri ikäluokkien välillä on mahdollista löytää.

Mikrosatelliitti on ns. markkerigeeni, jota käytetään geneettisen tutkimuksen apuvälineenä (Goldstein & Schlötterer 1999). Mikrosatelliitit, kuten muutkin geenit, löytyvät kalojen (kuten korkeampien eliöiden yleensäkin) solujen tumissa sijaitsevista kromosomeista. Mikrosatelliitilla (mikrosatelliittigeenillä) tarkoitetaan sellaista osaa perimän DNA-sekvenssistä jossa tietyt emäkset toistuvat useita kertoja peräkkäin (esimerkiksi CACACA...). Mikrosatelliitilla yhden toistojakson pituus voi olla kahdesta viiteen emäsparia. Näiden toistojaksojen määrä yksilöllä voi vaihdella. Yksilöllä voi siis olla tietyistä mikrosatelliittigeenistä erilaiset geenimuodot eli alleelit (esimerkiksi CACA ja CACACA). Tätä emäksien lukumäärän vaihtelua kutsutaan mikrosatelliittimuunteluksi.

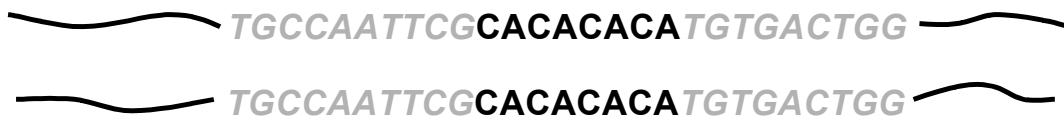
Kullakin yksilöllä on kussakin mikrosatelliittilokuksessa (geenipaikassa) kaksi alleelia, jotka voivat olla saman- tai eripituisia. Näistä toinen on peritty 'äidiltä' ja toinen 'isältä'. Yksilöä, jonka molemmat alleelit ovat samanlaiset, kutsutaan homotsygoottiseksi tämän mikrosatelliittilokuksen suhteen (esim. CACA ja CACA). Vastaavasti erilaiset alleelit omaavaa yksilöä kutsutaan heterotsygoottiseksi (esim. CACA ja CACACA). Mitä enemmän näitä eri geenimuotoja kunkin kannan yksilöiltä löytyy, sitä *monimuotoisempi* tuo kanta on.



Heterotsygoottinen yksilö:



Homotsygoottinen yksilö:



Kuva 1. Kaavakuva mikrosatelliittigeeneistä. Kirjainjonoilla on kuvattu kahden eri yksilön yhden mikrosatelliittilokuksen alleelit (CACA-emäsjaksot). Esimerkkinä heterotsygoottinen ja homotsygoottinen yksilö tämän mikrosatelliittilokuksen suhteen.

2.1.2. Pienet näytteet riittävät

Mikrosatelliittianalyysiin tarvittava DNA -määrä on erittäin pieni. Näytteeksi riittää pieni evänpalane, verinäyte tai suomu, jolloin näytteet voidaan ottaa myös eläviltä kaloilta. Näytteet voidaan säilöä etanoliin ja säilyttää huoneenlämmössä useita vuosia, mistä on huomattavaa etua varsinkin, kun näytteet on otettava kenttäolosuhteissa.

Merkittävä etu on myös mahdollisuus analysoida hyvinkin vanhoja näytteitä. Vanhoista suomunäytteistä (suomujen pinnalla olevista ihosoluista) on mahdollista eristää ja monistaa DNA:ta mikrosatelliittianalyysiin tarvittava määrä. Tällöin voidaan vertailla nykyään elävien kalojen geneettistä monimuotoisuutta siihen monimuotoisuuteen, joka populaatiossa vallitsi esimerkiksi ennen luonnontilan muuttumista tai istutustoiminnan aloittamista.

Käytännössä näytteenotto tapahtuu leikkaamalla saksilla tai terävällä veitsellä pieni palanen (1×1 mm tai vähän suurempi) mistä tahansa evästä (harjuksilla kuitenkin mieluummin rasvaevästä). Evänpalane tulee säilöä näyteputkeen vähintään 95% puhtaaseen etanoliin. Sakset tai veitsi on syytä pyyhkiä paperiin ja mielellään kastaa etanoliin joka leikkauksen välissä, jotta soluja ei kulkeudu välineiden mukana näytteestä

toiseen. Tarvittaessa useita näytteitä voi säilöä samaan purkkiin, mikäli leikatut palaset ovat ehjiä (jotta eri yksilöiden näytteet pysyvät erillään).

Näytteiden käsittelyä laboratoriossa on esitelty tarkemmin muissa yhteyksissä (esim. Aho 1999 ja Primmer ym. 1999).

2.2. Mitä mikrosatelliitit voivat kaloista kertoa?

Mikrosatelliittigeenit ovat mendelistisesti periytyviä (jälkeläinen perii toisen alleelin äidiltään ja toisen isältään), joten ne soveltuvat erityisen hyvin paitsi geneettisen muuntelun kuvaamiseen, myös sukulaisuussuhteiden ja vanhempien selvittämiseen viljelyyn otetuissa emokalaparvissa ja niistä tuotetuissa jälkeläistöissä. Tällöin voidaan suoraan seurata sitä, kuinka hyvin eri perheiden jälkeläiset selviytyvät viljelyolosuhteissa. Myös yksilöiden väliset sukulaisuussuhteet on mahdollista selvittää vertailemalla yksilöiden geenimuotoja keskenään ja niiden samankaltaisuutta koko populaation tai parven geenimuotoihin verrattuna. Tällöin selviää esimerkiksi se, kuinka paljon täyssisaruksia tietyn ikäluokan parvessa on. Ehkä tärkeintä ja kaikkein arvokkainta on kuitenkin saada mikrosatelliittien avulla selkoa siitä, miten luonnosta saatu perinnöllinen aines säilyy viljelyolosuhteissa ja kuinka hyvin luonnon valitsema perimä saadaan siirrettyä istukaspopulaatioihin ja takaisin luonnonvalinnan vaikutuspiiriin.

Mikrosatelliittiaineistosta voidaan myös selvittää, onko populaatio kulkenut geneettisen pullonkaulan läpi, toisin sanoen onko populaation lisääntyvien yksilöiden määrä ollut jossain vaiheessa niin alhainen, että se on vaikuttanut populaation geneettiseen koostumukseen. Myös lisääntyvien yksilöiden määrä, eli efektiivinen populaatiokoko on mahdollista laskea geenimuotojen esiintyvyyksien perusteella. Tällöin voidaan saada selville esimerkiksi kunkin parven perustajien todellinen määrä, eli onko kaikkien hedelmöityksiin käytettyjen koiraiden ja naaraiden jälkeläisiä selvinnyt poikasiksi (tai aikuisiksi) asti. Odotettua (Hardy-Weinbergin tasapainon mukaista) heterotsygotia-astetta ja havaittua heterotsygotia-astetta vertaamalla voidaan myös selvittää poikkeako jonkin populaation geneettinen rakenne satunnaisesta, toisin sanoen esiintyykö populaatiossa esimerkiksi sukusiitosta. Poikkeamia H-W -tasapainosta voidaan myös käyttää apuna päätellessä ovatko kannat (tai parvet) mahdollisesti sekoittuneet keskenään.

Yksittäisten parvien ja kantojen ominaisuuksien selvittämisen lisäksi voidaan tietysti vertailla eri kantoja keskenään. Tällöin voidaan populaatioiden välisiä geneettisiä eroja testata tilastollisilla testeillä, esimerkiksi testaamalla eroja geenimuotojen taajuuksissa. Erojen suuruutta kuvaamaan voidaan laskea nk. F_{ST} -arvo, mikä kertoo sen, kuinka monta prosenttia kokonaisuunneltusta esiintyy populaatioiden välillä ja kuinka paljon populaatioiden sisällä. Tämä on siis suora populaatioiden välisten erojen suuruuden mittari; mitä suurempi F_{ST} -arvo, sitä erilaisempia populaatiot ovat. Useiden kantojen välisiä eroja voidaan myös tarkastella geneettisten etäisyyksien avulla. Tällöin kantojen geneettisen samankaltaisuuden perusteella voidaan rakentaa 'sukupuu', joka kertoo kuinka läheistä sukua (kuinka geneettisesti samankaltaisia) kannat toisiinsa nähden ovat.

Eriyisen käyttökelpoinen sovellutus on yksilöiden määrittäminen 'oikeisiin' populaatioihinsa kuuluviksi. Tällöin voidaan analysoida epäilyttävät kalat, ottaa näytteet niistä kannoista, joihin kalat todennäköisesti kuuluvat, ja tietokoneohjelman avulla määrittää, mitä kantaa lähimpänä tutkittavat kalat ovat. Käytännön esimerkkejä tästä voivat olla mm. saaliskoostumuksen (saaliskalojen alkuperän) seuranta, vaelluskalojen ekosysteemien kotijoen selvittäminen, mahdollisten laitoksilta karanneiden kalojen osuuden arvioiminen tai vaikkapa kalastuskilpailujen tuloskiistojen ratkaiseminen, jos voittokalan saantipaikasta on epäselvyyttä (esim. Primmer ym. 2000).

2.3. Mikrosatelliitit ja muut perimän tutkimismenetelmät

2.3.1. Mikrosatelliitit verrattuna entsyymielektroforeesiin

Mikrosatelliittisekvenssien havaittu mutaationopeus on huomattavan suuri, jopa nelinkertainen allotsyymeihin verrattuna, minkä ansiosta myös mikrosatelliittien muuntelun määrä on huomattavasti suurempaa kuin aikaisemmin paljon käytetyllä entsyymielektroforeesilla havaittu muuntelu. Mikrosatelliittilokuksissa on yleensä enemmän alleeleja ja heterotsygotia-aste on usein yli 50 %. Tämän ansiosta mikrosatelliittimenetelmä soveltuu erittäin hyvin populaatioiden muuntelun määrän ja geneettisen rakenteen kuvaamiseen. Koska mikrosatelliitit ovat hyvin muuntelevia, sopivia markkereita käyttäen pienetkin populaatioiden väliset erot, esimerkiksi joen eri haaroissa lisääntyvien kantojen erilaistuminen, on mahdollista löytää. Entsyymielektroforeesia käytettäessä tällainen mittaustarkkuus on usein mahdotonta vähäisen muuntelun takia. Mikrosatelliittimenetelmällä onkin löydetty geneettisiä eroja sellaisten populaatioiden välillä, jotka on allotsyymitoissa todettu geneettisesti samanlaisiksi. Suuresta muuntelun määrästä on etua myös vanhemmuusanalyyseissä; mikrosatelliiteilla voidaan saavuttaa yli 99 %:n luotettavuus oikeiden vanhempien selvittämisessä, kun se allotsyymejä käytettäessä jää parhaimmillaankin n. 50 %:iin.

Mikrosatelliiteilla voidaan myös selvittää yksilöiden välisiä geneettisen monimuotoisuuden eroja ja näin liittää geneettinen tieto esimerkiksi yksilöiden lisääntymisominaisuuksiin.

Entsyymielektroforeesin käyttöä rajoittaa muuntelevien lokusten pieni määrä, kudosnäytteiden oton edellyttämä kalojen tappaminen, näytteiden välitön pakastaminen ja myös säilytys pakastettuna. Toisaalta mikrosatelliittianalytiikka on huomattavasti kalliimpaa ja osin työläämpää kuin allotsyymien käyttö. Mikrosatelliittitekniikan automatisointi näytteiden ajosta aineiston käsittelyyn kuitenkin mahdollistaa nopeamman ja tehokkaamman aineiston analysoinnin kuin elektroforeesia käytettäessä. Kustannuksia voidaan myös alentaa optimoimalla analytiikka siten, että mahdollisimman suuri määrä näytteitä ja lokuksia analysoidaan kerralla. Kustannukset myös vaihtelevat huomattavasti tutkimuksessa tarvittavien lokusten määrästä riippuen.

Tietoa eri molekulaaristen menetelmien käytöstä löytyy enemmän esim. teoksesta Smith & Wayne (1996).

2.3.2. Eri menetelmillä saatujen tietojen yhdistely

Parhaimmillaan eri tarkoituksissa käytettävillä geneettisillä menetelmillä saadut tiedot tukevat ja täydentävät toisiaan. Mikrosatelliittiaineiston parhaita puolia ovat sen tarkkuus ja monipuolisuus, mikä mahdollistaa populaatioiden tilan tarkan analysoinnin ja seurannan. Toisaalta esimerkiksi mitokondrio-DNA -aineistot saattavat antaa parempaa tietoa populaatioiden leviämishistoriasta. Tällöin yhdistämällä nämä hieman erityyppiset aineistot keskenään, saadaan usein hyvin kattava ja monipuolinen tietopaketti populaatioiden historiasta ja nykytilasta.

Mikäli halutaan suoraan verrata keskenään esimerkiksi eri populaatioiden monimuotoisuuden tasoa, tulee vertailut pääsääntöisesti tehdä samaa menetelmää käyttäen. Tämä siksi, että esimerkiksi heterotsygotia-asteet vaihtelevat eri menetelmien kesken suuresti, ja tällöin niiden suora vertailu ei ole mahdollista. On myös syytä muistaa, että jopa saman menetelmän sisällä esiintyy vaihtelua, koska eri mikrosatelliittigeenipaikkojen heterotsygotia-asteet voivat olla hyvinkin erilaisia. Mikäli eri populaatioita halutaan suoraan verrata keskenään, tulee vertailuun käyttää samoja mikrosatelliittilokuksia. Mikäli lasketaan keskiarvot esimerkiksi kuuden lokuksen heterotsygotia-asteista

tai alleelimääristä, tulee näiden kuuden lokuksen olla samoja vertailtavissa populaatioissa. Analysoidun yksilömäärän vaihtelu vaikuttaa luonnollisesti myös havaittujen geenimuotojen (alleelien) määrään, joten myös tutkitun yksilömäärän tulisi olla suunnilleen sama. Tämä ei kuitenkaan ole läheskään yhtä ongelmallista kuin eri lokusten vertailu, sillä yksilömäärän korjaamiseksi vastaamaan verrattavan populaation tasoa on olemassa laskentamenetelmä, jolloin tulokset saadaan vertailukelpoisiksi (Ewens 1972).

2.3.3. Mahdolliset uudet menetelmät

Mikrosatelliittitekniikka tarkastelee geneettisiä ominaisuuksia jo DNA:n emästen tasolla, eli pienimmistä perimän rakenneyksiköistä. Tätä tarkempaa menetelmää on siis vaikea kehittää. Tulevaisuuden kysymys lieneekin, onko mikrosatelliittitekniikka joissain tapauksissa liian tarkka menetelmä, eli muuntelua on joissakin tapauksissa liikaa, puhutaan hypermuuntelevista lokuksista. Molekyyligenetiikka tieteen apuvälineenä kehittyy kuitenkin nopeasti, joten on todennäköistä, että uusia menetelmiä kehitetään ja tulee käyttöön ajan mittaan. Tätä kirjoitettaessa ei kuitenkaan uusia mullistavia menetelmiä ole näköpiirissä, joten mikrosatelliittitekniikka tulee säilyttämään paikkansa erittäin käyttökelpoisena menetelmänä vielä pitkälle tulevaisuuteen.

3. Emokalastojen geneettisen tietokannan mittaristo

3.1. Monimuotoisuus

3.1.1. Havaittu geenimuotojen määrä

Havaittu geenimuotojen määrä tarkoittaa kussakin populaatiossa havaittuja saman geenin eri muotoja eli alleeleja. Jokaisella yksilöllä on kaksi kopiota kustakin geenistä, siis myös mikrosatelliittigeenistä, joista toinen on peritty naaraalta (äidiltä) ja toinen koiraalta (isältä). Harvinaiseksi geenimuodoksi sanotaan sellaista, jonka taajuus on alle 5 %, eli kyseistä geenimuotoa tavataan populaatiossa alle viidellä yksilöllä sadasta.

3.1.2. Heterotsygotia-aste, havaittu ja odotettu

Havaittu heterotsygotia-aste, lyhenteenä H_o , tarkoittaa erilaiset geenimuodot omaavien (heterotsygoottisten) yksilöiden suhteellista osuutta populaatiossa.

Odotettua heterotsygotia-astetta, lyhenteenä H_e , kuvaa myös termi geenidiversiteetti. H_e on geenimuotojen määrän perusteella laskettu odotettu heterotsygotia-aste. Geenidiversiteetti vastaa odotettua heterotsygotia-astetta satunnaisesti lisääntyvässä populaatiossa. Mikäli populaation tai kannan sisällä yksilöt lisääntyvät satunnaisesti, eikä esimerkiksi sukusiitosta tai yksilömäärän romahduksia ole esiintynyt, 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 voidaan testata tilastollisesti.

3.2. Efektiivinen populaatiokoko

3.2.1. Perustajayksilöt

Perustajayksilöillä tarkoitetaan viljelyyn otettavan parven hedelmöityksissä käytettyjä naaraita ja koiraita. Näiden emojen ominaisuuksista määräytyy hyvin pitkälle se, kuinka monimuotoinen tuleva viljelty emoparvi geneettisesti on (vrt. efektiivinen koko). Teoriassa emoparveen voidaan saada korkeintaan sama määrä perinnöllistä muuttelua kuin perustajayksilöissä on olemassa. Käytännössä toteutuneeseen efektiiviseen kokoon vaikuttavat mm. perustajaemojen paritustavat, jälkeläismäärän vaihtelu eri perheissä (parituksissa) ja mahdollisesti eri tavoin parven sisällä ilmenevä kuolevuus ennen sukukypsyysikä.

3.2.2. Teoreettinen efektiivinen populaatiokoko (N_e)

N_e kuvaa lisääntyvän eli perinnöllisessä mielessä tehokkaan populaation kokoa, mikä on aina pienempi kuin populaation yksilöiden kokonaismäärä. Tarkkaan ottaen efek-

tiivistä populaatiokokoa kuvaavilla kaavoilla lasketaan, millä todennäköisyydellä sama geeni kahdella yksilöllä on peräisin samalta naaraalta ja samalta koiraalta. Sen laskemiseen ideaalipopulaatiossa, jolta luonnossa edellytetään mm. vakaata populaatiokokoa, satunnaista pariutumista ja tasaista sukupuolijakaumaa ym., käytetään eri tilanteissa seuraavia kaavoja (kts. Roff 1997):

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 naarailla 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.

3.2.3. 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 (merkittävästi eksykkejä, karkulaisia laitoksilta tai istutuksia vierailta kannoilla) esiintyy, arvio efektiivisestä populaatiokoosta saattaa olla liian suuri. Menetelmä on sitä tarkempi, mitä suurempi analysoitu yksilömäärä on, joten alle 20 yksilön otoksista laskettuihin tuloksiin on suhtauduttava varauksella. Edelleen, mitä vanhemmasta parvesta on kysymys, sitä enemmän yksilöitä on todennäköisesti kuollut. Tämä pienentää mikrosatelliittiaineistosta laskettua efektiivistä perustajamäärää, mutta kylläkin kuvaa hyvin kyseisen parven jälkeläistölle välittämää perinnöllisen taustan laajuutta. Toisin sanoen, mitä nuoremasta parvesta on kysymys, sitä luotettavampi aineistosta laskettu perustajapopulaation efektiivinen koko on.

3.3. Geneettinen pullonkaula

Geneettiseksi pullonkaulaksi kutsutaan tilannetta, jossa populaation lisääntyvien yksilöiden määrä on romahtanut hyvin pieneksi. Tämä näkyy mikrosatelliittiaineistossa voimakkaana heterotsygotiaylijäämänä, mikä on myös tilastollisesti testattavissa (Lui-kart & Cornuet 1998). Kyseinen testi vaatii kuitenkin vähintään kymmenen mikrosatelliittigeenipaikan analysointia luotettavien tulosten saamiseksi. Viljelyssä olevien emokalastojen perimän ja monimuotoisuuden kartoitustyössä ei ole tilastollista testiä käytetty, vaan geneettisen pullonkaulan mahdollisuuteen viitataan tapauksissa, joissa heterotsygotiaylijäämää aivan ilmeisesti esiintyy.

3.4. Yksilöiden välinen sukulaisuus

Mikrosatelliittiteknikka on tuonut muassaan myös mahdollisuudet selvittää parven tai populaation yksilöiden välisiä sukulaisuusasteita. RKTL:n emokalastojen analyyseissä käytetty nimenomaan mikrosatelliittiaineistoille kehitetty menetelmä on uusi ja sitä sovelletaan tiettävästi ensimmäistä kertaa viljelyparvien sukulaisuusasteiden laskemiseen.

Parven yksilöiden välinen keskinäinen sukulaisuusaste, r -arvo, on laskettu käyttäen ohjelmaa Delrious (Björklund & Stone 2001). Ohjelma laskee mikrosatelliittiaineistosta jokaisen yksilöparin välisen sukulaisuuden, ja näistä pareittaisista arvoista on laskettu keskiarvo koko parvelle. Täyssisaruksia vastaa r -arvo 0,5, arvo $r = 0,25$ tarkoittaa puolissisaruksia ja $r = 0,125$ serkuksia. Tutkituille taimenten, harjusten ja siikojen kullekin emoparvelle on laskettu täyssisaruparien ja sukulaisparien osuudet kaikista pareittaisista vertailuista. Täyssisaruna pidetään kaloja, joiden $r > 0,375$ ja sukulaisuuden tilastollisena raja-arvona päädyttiin aineiston tarkastelun perusteella käyttämään r -arvoa $>0,07$.

Tämä uusi menetelmä on myös sitä tarkempi, mitä suurempi tutkittu yksilömäärä ja analysoidujen geenipaikkojen määrä on. Mahdolliset poikkeamat Hardy-Weinbergin tasapainosta vaikuttavat r -arvoihin (menetelmä edellyttää satunnaista pariutumista), joten niiden parvien tai populaatioiden osalta, joissa poikkeamia havaitaan, tulee r -arvoja tarkastella viitteellisinä. Tässä vaiheessa menetelmää kannattaa käyttää lähinnä emoparvien keskinäisessä vertailussa.

Emokalastojen geneettisessä tietokannassa sukulaisuusaste on varsinaisen tutkimukseen perustuvan luokittelun peruseriaatteiden puuttumisen johdosta käsitellyn aineiston tarkastelun perusteella päädytty luokittelemaan seuraavasti:

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

3.5. Kantojen väliset erot

Kantojen välisten erojen analyysi perustuu eroihin geenimuotojen taajuuksissa sekä määrissä. Geenimuotojen taajuuksiin perustuva testi (population differentiation test) kertoo onko kantojen välillä eroja geenimuotojen taajuuksissa. F_{ST} -arvo puolestaan mittaa kantojen välisen erilaisuuden suuruutta, eli montako prosenttia kokonaismuuntelusta esiintyy kantojen välillä verrattuna kantojen sisäiseen geneettiseen muunteluun (esim. $F_{ST} = 0,0529$ tarkoittaa sitä, että 5,29 % mitatusta tai havaitusta muuntelusta esiintyy kantojen välillä ja loput kantojen sisällä, eli ovat yksilöiden välisiä). Mitä suurempi F_{ST} -arvo on, sitä erilaistuneempia kannat ovat. F_{ST} -arvon tilastollinen merkitsevyys kertoo sen, poikkeako arvo nolasta. Mikäli arvo ei ole tilastollisesti merkitsevä, kannat eivät siten ole geneettisesti ainakaan tutkittujen lokusten osalta erilaistuneita. Mikrosatelliittimenetelmän tarkkuuden ansiosta menettely on varsin oleellinen kantojen erilaisuutta arvioitaessa.

Alla olevaan taulukkoon 1 on kerätty esimerkkejä geenimuototestin tuloksista ja F_{ST} -arvoista.

Taulukko 1. Eräiden plankton-, pohja- ja järvisiikakantojen sekä peledsiian väliset F_{ST} -arvot tilastollisine merkitsevyyksineen (ylempi rivi) ja geenimuotojen taajuuksia testaavan analyysin tulos (alempi rivi). Merkitsevyytaset ovat seuraavat:

***: $p < 0,001$, **: $0,001 < p < 0,01$, *: $0,01 < p < 0,05$, NS: ei tilastollisesti merkitsevä.

	Plankton-siika, Sotkamon reitti	Plankton-siika, Pielisjoki	Plankton-siika, Koitajoki	Pohjasiika, Kallunkijärvi	Pohjasiika, Ivalojoiki	Järvisiika, Simpeleenjärvi
Plankton-siika, Pielisjoki	0,00162*** **					
Plankton-siika, Koitajoki	0,00162*** ***	0,00041 NS NS				
Pohjasiika, Kallunkijärvi	0,00568*** ***	0,00488*** ***	0,00513*** ***			
Pohjasiika, Ivalojoiki	0,00152*** ***	0,00111*** *	0,00081** *	0,00535*** ***		
Järvisiika, Simpeleenjärvi	0,00132*** ***	0,00121** ***	0,00121*** **	0,00528*** ***	0,00111*** *	
Järvisiika, Vuohijärvi	0,00530*** ***	0,00614*** NS	0,00531*** NS	0,00854*** ***	0,00552*** NS	0,00635*** *
Peledsiika, Endyr-järvi	0,25079*** ***	0,24869*** ***	0,24883*** ***	0,24859*** ***	0,24848*** ***	0,24956*** ***

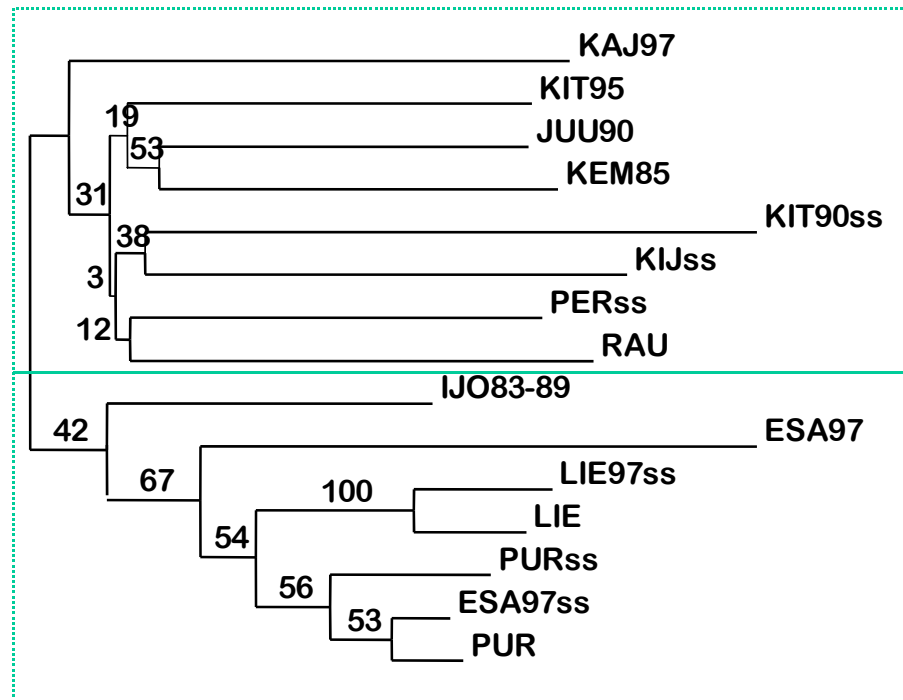
3.6. Kantojen väliset geneettiset etäisyydet

Kantojen väliset geneettiset etäisyydet on laskettu käyttämällä Nei DA distance –menetelmää. Menetelmän tuottama ja tietokoneen laatima 'puudiagrammi' kertoo eri kantojen suhteellisen geneettisen etäisyyden toisistaan. Mitä lähemmäs toisiaan kannat

sijoittuvat, sitä läheisempää 'sukua' ne keskenään ovat. Jokaisen viivan (oksanhaaran) alussa oleva numero kertoo kuinka todennäköistä on, että kanta sijoittuu juuri kyseiseen kohtaan puuta. Mikäli luku on yli 50, tarkoittaa se yli 50 %:n todennäköisyyttä, ja sijoittumista voidaan pitää melko varmana. Viivojen pituudet ovat puolestaan geneettisen erilaisuuden mitta, eli mitä pidempi ja muista erottuva viiva, sitä enemmän kanta poikkeaa muista kannoista.

Alla oleva esimerkki (kuva 2) havainnollistaa harjuskantojen välisiä geneettisiä etäisyyksiä.

RKTL:n harjuskantojen sukupuu



Kuva 2. Viljelyssä olevien harjuksen emokalastojen geneettiset etäisyydet.

ESA = Etelä-Saimaa, IJO = Iijoki, JUU = Juutuanjoki, KAJ = Kajaaninjoki (nyk. Oulujoen vesistö OUV), KEM = Kemijoki, KIJ = Kitkajoki, KIT = Kitkajärvi, LIE = Lieksanjoki, PER = Perämeri (kantalyhenne nyk. KRU), PUR = Puruvesi, RAU = Rautalammin reitti. ss = luonnonkaloja.

4. Emokalojen viljelyn menettelytavat ja geneettinen monimuotoisuus

4.1. Hedelmöitysmenettelyt

Hedelmöitystavalla on suuri vaikutus perustettavaan emokalastoon tallentuvaan perinnölliseen monimuotoisuuteen. Vaikka käytössä olisi runsaastikin yksilöitä ja naaraiden ja koiraiden määrä sama, voidaan eri tavoin toimien saada jälkeläistöön enemmän tai vähemmän monimuotoisuutta. Erilaisia hedelmöitysmenetelmiä on nimetty seuraavasti:

a) Rutiinihedelmöitys

Satunnaisesta määrästä naaraita mäti lypsetään yhteen astiaan ja hedelmöitetään satunnaisella määrällä koiraita. Tällöin ei voida ennakoida, mikä koiras hedelmöittää minkäkin naaraan. Usein sekä koiraiden että naaraiden hedelmöitysominaisuudet vaihtelevat yksilöllisesti, joten syntyvässä jälkeläistössä on erilaisia määriä eri vanhempien jälkeläisiä. Kokeellisesti on osoitettu, että jotkin koiraat hedelmöittävät valtaosan (>60 %) mädistä, kun hedelmöitykset tehdään usean koiraan yhdistetyllä maidilla (Gharrett and Shirley 1985, Withler 1988). Rutiinihedelmöityksen seurauksena voi jonkin koiraan tai naaraan jälkeläistö olla enemmistönä ja joidenkin taas puuttua jopa kokonaan. Sen vuoksi tätä hedelmöitysmenetelmää ei pidä lainkaan käyttää emoparvien perustamishedelmöityksissä, eikä sitä suositella käytettäväksi istukaspoikastuotannossakaan.

b) Parittainen hedelmöitys

Yhden satunnaisesti valitun naaraan mäti hedelmöitetään yhdellä niinikään satunnaisesti valitulla koiralla. Tämä menetelmä on ainoa tapa varmistaa, että juuri käytetyt emot osallistuvat hedelmöitykseen ja että kaikkien naaraiden ja koiraiden perimällä on mahdollisuus siirtyä tulevalle sukupolvelle. Emoparvien perustamisessa parittaista hedelmöitystä voidaan käyttää, kun luontaisesti lisääntyvä kanta on runsas. Parittaista hedelmöitystä suositellaan käytettäväksi myös emokalanviljelyyn perustuvassa istukaspoikastuotannossa.

c) Faktoriaalinen hedelmöitys

Yhden naaraan mäti jaetaan muutamaaan osaan, jotka kukin hedelmöitetään eri koiraila. Seuraavan naaraan mäti jaetaan samoin eriin, mutta osa hedelmöitykseen käytetyistä koiraista vaihdetaan uusiin osan ollessa samoja kuin ensimmäisen naaraan mädillä, jne. Tämä menetelmä on perinnöllisessä mielessä tehokkaampi kuin parittainen hedelmöitys, mutta samalla selvästi työlämpi. Faktoriaalinen hedelmöitys on suositeltava emokalastojen perustamishedelmöityksiin, jos täydellistä hedelmöitystapaa ei jostain syystä voida noudattaa.

d) Täydellinen hedelmöitys

Kunkin naaraan mäti jaetaan yhtä moneen osaan kuin koiraita on käytettävissä, ja sitten jokainen erä hedelmöitetään eri koiralla. Perinnöllisesti tämä on tehokkain tapa, koska silloin kaikista yksilöistä saadaan muodostettua maksimaalinen määrä perheitä eli erilaisia geneettisiä yhdistelmiä. Täydellinen hedelmöitys on paras emokalastojen perustamishedelmöityksiin ja sitä on syytä käyttää aina kun perustajayksilömäärä jää alle 25 parin.

		Parittainen hedelmöitys						Faktoriaalinen hedelmöitys						Täydellinen hedelmöitys									
		koiras						koiras						koiras									
naaras		1	2	3	4	5	6	naaras		1	2	3	4	5	6	naaras		1	2	3	4	5	6
1	x							1	x	x	x					1	x	x	x	x	x	x	
2		x						2		x	x	x				2	x	x	x	x	x	x	
3			x					3			x	x	x			3	x	x	x	x	x	x	
4				x				4				x	x	x		4	x	x	x	x	x	x	
5					x			5					x	x		5	x	x	x	x	x	x	

Kuva 3. Kaavamainen esitys hedelmöitysmenettelyistä.

4.2. Emoparven mitoitus

Hedelmöitystavan lisäksi syntyvän jälkeläistön perhekohtaisilla määräsuhteilla on suuri vaikutus emoparven geneettiseen koostumukseen ja siten edelleen näiden emokalojen istutettavaan jälkeläistöön. Sen vuoksi emoparven koko tulee ennakoida jo hedelmöitysvaiheessa, sillä jos parvea joudutaan karsimaan kasvatuksen aikana, menetetään helposti perustamisessa aikaansaatu perinnöllistä monimuotoisuutta. Koska yksilöitä ei pystytä tunnistamaan, karsinta on väistämättä satunnaista ja silloin sattuma sanelee, kuinka paljon perheitä jää karsittuun emokalastoon. Mitä pienempi perustajamäärä on ollut ja mitä suurempi karsiminen jälkeläistössä on tapahtunut tai tehtävä, niin sitä varmemmin menetetään joitakin perheitä kokonaan (kuva 4).

Parasta on tasoittaa perheeseen vaihtelua ja sen vaikutuksia ottamalla esimerkiksi jo hedelmöityksen jälkeen yhtä paljon mätää jokaiselta perheeltä emoparven perustaksi. Jotta mädin alkuvaiheen kuolevuus tulisi huomioiduksi, olisi parempi hautoa kunkin perheen mätierät erillään ja ottaa tarvittava yhtä suuri mätimäärä, varmistavia rinnakkaisparvia unohtamatta, jokaisesta perheestä vasta silmäpistevaiheella. Tätä mallia voidaan käytännössä noudattaa ainakin kaikille petomaisille lohikalaille. Se on jonkin verran työläämpi kuin tasaus heti hedelmöityksen jälkeen, mutta se on myös perinnöllisesti selvästi tehokkaampi.

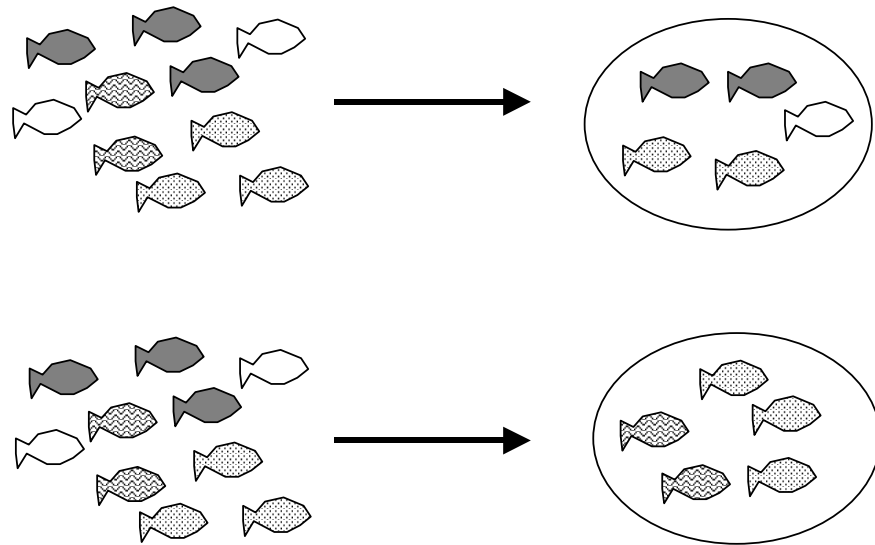
Siian ja harjuksen perhekohtainen mätimäärä voidaan tasoittaa ennen haudontasuppiin laittamista, mikäli perhekohtaista haudontaa ei voida järjestää.

Kuhan perinteinen mädinhankinta ja myös laitosemokalojen kudetuturoihin vastaa käytännössä parittaisen hedelmöityksen menetelmää. Kun kuoriutuvia poikasia kerätään, on perinnöllisessä mielessä välttämätöntä ottaa jokaiseen kasvatuserään poikasia mahdollisimman monesta tai kaikista kuoriutuvista eristä eli perheistä.

Perinnölliseltä kannalta tehokkaimpaan tilanteeseen päästäisiin, mikäli kaikkien viljeltävien emokalastojen perustaksi käytettävät perheet pystyttäisiin merkitsemään. Silloin missä tahansa kasvatuksen vaiheessa voitaisiin päättää sopiva parven koko. Optimaalinen tilanne olisi silloin, kun kultakin perheeltä otettaisiin emoparveen yhtä monta koirasta ja naarasta. Käytännössä tämä saattaa olla vaikeaa, mutta edellä kuvatuista malleista soveltaen on ainakin mahdollista välttää kalalajien ja -kantojen perinnöllisen monimuotoisuuden säilyttämisen hankalimmat karikot.

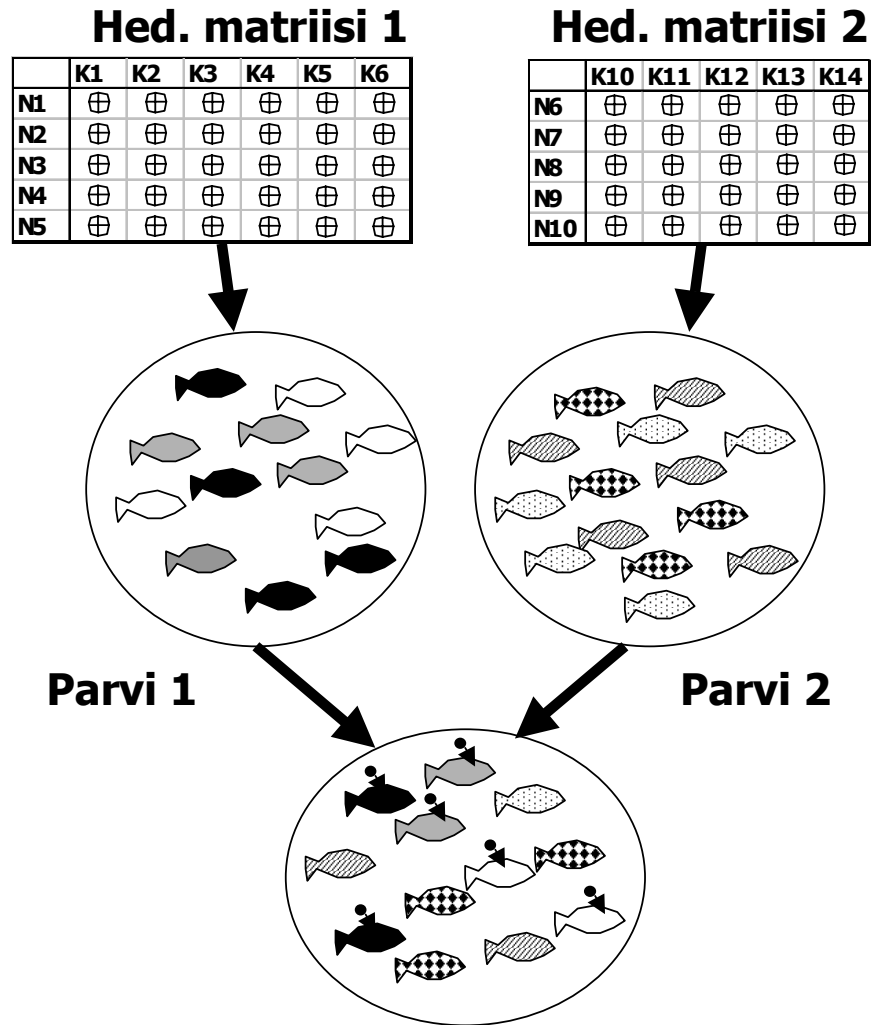
4.3. Yksi vai useita emoparvia?

Kysymystä siitä, kuinka monta emoparvea viljelyssä tulee samanaikaisesti pitää, joudutaan miettimään paitsi monimuotoisuuden säilyttämisen kannalta, niin myös resursien, mädintuotantotarpeiden ja tilojen näkökulmasta. Jos emoparvi kasvatetaan yhdessä allasyksikössä tai yhdestä perustajaryhmästä perustettuna useisiin altaisiin ja jaettuna parvena, menetetään tavallisesti keinot kontrolloida parven yksilöiden sukulaisuutta ja eri perheiden osuuksia parvessa. Siksi yhden parven sisäisillä hedelmöityksillä menetetään helposti perinnöllistä monimuotoisuutta ja lisätään sukusiitosta.



Kuva 4. Otannalla parvia perustettaessa tai jo kasvatettua parvea pienennettäessä voi olla tärkeä merkitys sille, kuinka hyvin eri perheet (geenimuodot) tulevat edustetuiksi. Kuvassa eri tavoin varjostetut kalat edustavat eri perheitä (tai eri geenimuotoja). Vasemmalla on lähtöpopulaatio, josta perustetaan emokalasto tai jota karsitaan kasvatuksen aikana ja oikealla kaksi esimerkkiä sattuman vaikutuksesta lopputulokseen. Sattuman vaikutus on sitä suurempi, mitä suurempi osa kaloista karsitaan

Jos perhemerkintä on mahdollista, ei tätä vaaraa tietenkään ole. Käytännössä meillä ei vielä ole yhtään perhemerkittyä luonnonkantaa emoparvien kasvatuksessa, vaikka menettelytapa onkin käytössä kirjolohen valintajalostusohjelmassa. Jos jostain syystä joudutaan tyytymään yhteen emoparvi-ikäluokkaan, voidaan menetellä siten, että jo perustamisvaiheessa tehdään kaksi perimältään erillistä parvea, joissa käytetyt vanhemmat eivät ole samoja. Parvet kasvatetaan erikseen koko niiden iän tai voidaan jopa yhdistää, mutta vasta merkitsemällä toisen parven kalat vaikkapa eväleikkauksella. Hedelmöitykset tehdään sitten aina eri emoista olevien ryhmien kesken ristiin (Kuva 5).



Kuva 5. Kaaviokuva yhden ikäluokan emokalaston perustamisvaiheista parven yhdistämiseen siten, että yhdistetyssä parvessakin voidaan hallita kunkin yksilön tausta ja siten välttää suoraa sukusiitosta parven sisäisissä hedelmöityksissä. Esimerkkitapauksessa hedelmöitykset olisi tehtävä siis merkittyjen ja merkitsemättömien naaraiden ja koiraiden kesken.

Yhden emoparven käyttöön liittyy aina myös rajallinen perustajamäärä ja tehtävän parven perinnöllinen laajuus (monimuotoisuus ja satunnaiset vaikutukset). On selvää, ettei yhteenkään viljelyssä pidettävään emoparveen saada kuin pieni osa lajin tai kannan perinnöllistä monimuotoisuutta, siksi useampien parvien kasvattaminen on monimuotoisuuden säilyttämisen kannalta välttämätöntä. Peräkkäisten vuosiluokkien avulla saadaan käyttöön laajempi geenipooli, ja hedelmöitettäessä parvia ristiin parannetaan jälkeläistön monimuotoisuutta yhden parven käyttöön verrattuna. Sukusiitosriskikin on tällöin huomattavasti pienempi kuin yhden parven tapauksessa.

Käytännössä tarpeellinen perinnöllisesti erilaisten emoparvioiden lukumäärä joudutaan harkitsemaan ja päättämään laji- ja kantakohtaisesti huomioiden mm. uhanalaisuus, viljelyn ja istutusten laajuus, mihin istutukset pääasiassa suuntautuvat (esimerkiksi luonnonkannan vahvistamiseen vai pelkästään kalastettavaksi tehtävien istutusten ma-

teriaalin geneettisellä laadulla voi olla eri tasovaatimukset). Ääripäänä voidaan pitää esimerkiksi järvilohia, jonka parvia uusitaan joka vuosi ja joita syksyn lypsyyssä käytetään ristiin jopa 4 – 6 vuosiluokkaa. Toisena ääripäänä voitaneen pitää esimerkiksi joitakin vahvoina luonnonkantoina esiintyviä siikoja.

4.4. Emoparvien tuottaman mädin käyttö istukastuotannossa

Sekä naaraiden että koiraiden yksilölliset lisääntymisominaisuudet vaihtelevat runsaasti saman ikäluokan sisälläkin, eli eri naarailta saadaan eri määrä hedelmöitettyä mätää tai jälkeläisiä. Kun huolella perustetun emokalaston parittaisilla hedelmöityksillä tuotetaan mahdollisimman monimuotoista alkumateriaalia, on tarpeen saada kaikkia tai ainakin mahdollisimman monia yhdistelmiä (perheitä) siirretyksi jatkokasvatukseen. Käytännössä tähän ei ole aina kiinnitetty huomiota ja mädin luovutusvaiheessa onkin voinut käydä niin, että muutaman parituksen (perheen) mätä on yksi toimituserä ja sitten aikanaan myös istutuserä. Eri perheistä tasaamalla kerätty mätierä täyttäisi myös monimuotoisuusvaatimukset.

Perheittäinen mätimäärän taseus on helpointa heti hedelmöityksen jälkeen ottamalla aina yhteen haudontaerään (saaviin, suppiloon jne) kustakin lypsypäivän aikana muodostetusta perheestä vakiomätimäärä, joka voidaan sitten haudata yhdistettynä. Keräämällä kuhunkin jatkokasvatukseen toimitettavaan mätierään mahdollisimman tasaisesti mätää kaikista haudontaeristä, saavutetaan perinnöllisen monimuotoisuuden kannalta huomattavasti parempi lopputulos kuin ottamalla mätä satunnaisesti suuresta haudottavana olleesta erästä. Menettelytapaa jonkin verran vaikeuttaa se, että mädin kehitysvaihe ja kuoriutumisen vaihtelee lypsyn aloittamisen ja lopettamisen välillä, ja monet jatkokasvatijat haluaisivat ottaa vastaan vain hyvin synkronissa olevaa mätää.

4.5. Emokalastojen uusiminen laitosemoista

Joidenkin lajien tai kantojen kohdalla tilanne luonnossa on sellainen, että emokalastoja ei pystytä sieltä uusimaan. Tällöin joudutaan perustamaan uusia emokalastoja jo viljelyyn saaduista emoparvista, kuten esimerkiksi Iijoen lohesta ja Saimaan nieriästä. Tätä tilannetta tulee kuitenkin välttää niin pitkään kuin suinkin ja toisaalta pyrkiä palaamaan vaikka istutusperäisten luonnosta pyydettyjen emokalosten kautta tapahtuvaan emokalastojen uusimiseen. Viljelyolosuhteet vaikuttavat parviin kohdistuvaan valintaan väistämättä toisin kuin luonnossa tapahtuisi. Sitä kautta vaikutuksia aiheutuu myös perinnölliseen koostumukseen ja ominaisuuksiin luonnosta poikkeavalla tavalla, vaikka perustamiseen olisikin saatu suuri joukko yksilöitä. Mitä useampia sukupolvia viljelyparvien varassa joudutaan toimimaan, sitä varmempaa on, että muutoksia perintötekijöiden keskinäisessä jakaumassa aiheutuu ja joitakin geenimuotoja todennäköisesti kokonaan häviää.

Näitä monimuotoisuuden köyhtymiseen vaikuttavia tekijöitä voidaan yrittää hidastaa ja lieventää pitämällä emoparvet suhteellisen suurina, huolehtimalla hedelmöitysmenettelystä ja huomioimalla yksilöiden väliset sukulaisuudet. Sukulaisuuksia voidaan nykyisin tutkia mm. mikrosatelliittitekniikalla ja mikäli parvi on ainutlaatuinen kannattaisi se tehdä ja merkitä samalla tutkittavat kalat yksilömerkeillä. Tällöin voidaan tietyt paritusyhdistelmät sulkea aina lähisukulaisuuden vuoksi pois. Menettelytavat on tarpeen suunnitella tapaus- ja parvikohtaisesti pitäen yleisperiaatteena sitä, että yksilömäärät maksimoidaan ja sukusiitos estetään. Näillä periaatteilla muodostetuista perheistä jälkeläismäärä tasaten voidaan sitten poimia yksi tai useampia taustaltaan erilaisia parvia jatkokasvatukseen uusiksi emokalastoiksi.

5. Käytännön sovellutuksia

5.1. Mädin ja maidin lyhytkestoinen säilytys

Petomaisten lohikalojen mäti ja (lohi, taimen, nieriä) maiti säilyy hedelmöitysmiskelpoisena varsin pitkäänkin asiallisesti säilytettynä. Emokalastojen perustamishedelmöityksiä suunniteltaessa tähän onkin on hyvä varautua. Mäti ja maiti säilyvät, kun ne lypsetään emoista aktivoimatta niitä ja säilytetään erillään sopivan viileässä (0-4 °C) esimerkiksi jäärouheen avulla. Mäti on parasta lypsää silloin, kun se kullakin naaraalla on juoksevaa. Mäti kannattaa ottaa talteen myös mm. yön aikana verkkoon kuolleilta naarailta, mikäli se on irrallaan kalan ruumiinontelossa. Ovuloitunut mäti on hedelmöityskelpoista, mutta jos mäti on edelleen kiinni kalvoissa, ei sitä pystytä hedelmöittämään.

Parhaiten mäti säilyy omassa ovarionesteessään esimerkiksi kannellisissa, laakeapohjaisissa muovivastioissa. Sopiva mätikerros säilytyksessä on vain noin 5-6 mätimunakerroksen vahvuinen. Vettä ei saa joutua säilytettävän mädin joukkoon. Pitempikestoisen säilytyksen aikana mätiastioita on hyvä muutaman päivän välein varovaisesti pöyräytellä, jotta pintakerroksessakin olevat mätimunat pysyvät kosteina.

Maidin talteenotto on tehtävä huolellisesti, sillä siittiöt aktivoituvat välittömästi joutuessaan kosketuksiin veden tai virtsan kanssa. Kerran aktivoiduttuaan ne ovat hedelmöityskykyisiä vain hetken ajan ja sen jälkeen käyttökelvottomia. Kalojen siittiötiehyillä ja virtsarakolla on yhteinen aukko ruumiin ulkopinnalle, joten värittömän, laimean virtsan joutuminen maidin joukkoon tapahtuu helposti huomaamatta maidin lypsyn yhteydessä. Maiti lypsetään normaalisti käsin puristamalla esimerkiksi minigrip-pussiin tai muovipurkkiin, johon laitetaan puhdasta happikaasua ennen sulkemista. Kun maitipussit tai purkit säilytetään jäärouheen päällä, säilyvät siittiöt hedelmöityskelpoisina ainakin parin viikon ajan. Maitipusseihin tai purkkeihin on lisättävä happea muutaman päivän välein, vaikkei säilytysastioita avattaisikaan.

Siittiöiden elinkelpoisuus (hedelmöityskelpoisuus) voidaan testata mikroskoopin ja esim. solujen laskennassa käytettävän kammion (mm. Bürker- tai Thoma-kammiot) avulla. Pieni pisara maitia laitetaan sellaisenaan laskentakammioon, joka peitetään peitinlasilla. Sen jälkeen kammiossa oleva maitipisara asetetaan mikroskoopin näkökenttään (noin 100-400-kertainen suurennos). Mikäli siittiöt ovat kunnossa, eivät ne vielä tässä vaiheessa liiku.

Kun kammion kapillaaritilaan (peitinlasin alle) imeytetään vettä tai hedelmöitysluostaa, aktivoituvat kunnossa olevat siittiöt välittömästi eikä yksittäisten siittiöiden liikettä pysty aluksi erottamaan. Noin 15-20 sekunnin kuluttua massaliike alkaa tasoittua rauhallisemmaksi, jolloin yksittäisten siittiöiden liike alkaa erottua. Tavallisesti liike lakkaa jo noin 30-40 sekunnin kuluessa. Testi on helppo ja nopea tehdä ja se on luotettava keino maidin hedelmöityskyvyn varmistamiseksi.

Nämä säilytysmenetelmät antavat aikaa kerätä saman pyyntikauden emojen sukutuotteet laitoksille, missä emokalastojen perustamishedelmöitykset voidaan sitten tehdä ilman suurempaa hoppua.

Siian mädin säilyttämisestä hedelmöittämättömänä ei ole juuri kokemuksia, koska siihen ei tavallisesti ole ollut tarvetta. Säilyvyyden testaaminen on siten tarpeen ennen kuin siitä voidaan antaa kokemukseräistä suositusta. Siian maitia on säilytetty happipakkauksissa jäärouheen päällä ja ainakin muutamia päiviä se on säilynyt hedelmöityskelpoisena.

5.2. Emoparvien perustamishedelmöitykset

5.2.1 Petomaiset lohikalat

Lohen, taimenen ja nieriän emoparvien perustamishedelmöitykset voi ja sukutuotteiden helpon säilytyksen ansiosta kannattaakin tehdä vasta laitoksella, jossa olosuhteet voi järjestellä maasto-oloja paremmiksi ja hedelmöitetyn mädin kuljettelemiselta välttää. Täydellistä hedelmöitystä tehtäessä on hyvä järjestää riittävästi pöytätilaa, johon mädin hedelmöityksessä tarvittavat purkit tai muut astiat mahtuvat. Mädin hedelmöityksastioiksi ovat esim. viilipurkin tapaiset muovirasiat (mm. Polarcup) osoittautuneet erinomaisiksi.

Sopiva mätimäärä yhtä perhettä varten on petomaisilla lohikaloilla noin 100-200 mätimunaa. Sen voi helposti mitata esimerkiksi lääkelasilla (jossa on tilavuusasteikko 30 ml:aan saakka) tai punnitsemalla. Tilavuuteen perustuva mittaus on käytännössä nopeampi ja aivan riittävän tarkka, kunhan on aluksi selvitetty 100-200 munan tilavuus. Hedelmöitykset on syytä järjestää siten, ettei kerralla käsiteltävä naaras- ja siten purkimäärä nouse liian suureksi. Noin 30-40 perheen hedelmöityserät on helppo pitää järjestyksessä eikä niiden hedelmöitykseen kulu niin paljoa aikaa, että mädin lämpiämisestä tai kuivumisesta ehtisi aiheutua vaaraa hedelmöitymiselle. Purkit järjestetään matriisin muotoon, jolloin riveinä voidaan pitää naaraita ja sarakkeina koiraita; esim. 5 naarasta x 6 koirasta eli yhteensä 30 perhettä (purkkia). Purkit merkitään huolellisesti naaraan ja koiraan koodeilla tai numeroilla sekaantumisen estämiseksi.

Hedelmöitysluoksen (Billard 1990; 0,9% NaCl, 20 mM TRIS ja 30 mM glysiini) käyttö on suositeltavaa säilytettyjen sukusolujen hedelmöityksissä. Ennen käyttöä hedelmöitysluoksen lämpötila säädetään samaksi, mikä hautomoveden lämpötila on. Hedelmöitysluosta lisätään mädin päälle siten, että mätimunat peittyvät liuokseen. Tarkka määrä ei ole ratkaisevaa hedelmöityksen kannalta.

Siittiöiden liikkuvuus on hyvä tarkastaa ennen hedelmöityksiin ryhtymistä. Normaalisti liikkuvilla siittiöillä hedelmöitettäessä annostelu voidaan tehdä esim. automaattipipetillä ja jo 25-50 µl (eli 0,025-0,050 ml) maitia riittää varmuudella 100-200 mätimunaa hedelmöittämiseen. Liikkumattomilla tai huonosti liikkuvilla (<30 % liikkuvia siittiöitä) siittiöillä ei kannata hedelmöittää, varsinkaan, jos koirat ovat vielä säilytyksessä. Mikäli koirat on jo tapettu tai laskettu vapaaksi, on tietenkin pakko yrittää hedelmöitystä heikosti liikkuvillakin siittiöillä. Silloin mätimäärää pitää lisätä ainakin 10-20-kertaiseksi (eli noin 0,250-1,0 ml) normaaliin määrään verrattuna. Samalla on hyvä lisätä myös hedelmöitysluoksen määrää, sillä kuolleet siittiöt voivat edelleen alentaa mädin hedelmöitystulosta.

Maidin lisäämisen jälkeen hedelmöitettävää mätierää on hyvä sekoittaa esim. pyöritellen purkkia tai puhtaalla (muista aina vaihtaa sekoitusväline vaihtaessasi purkkia, koska siittiöitä siirtyy muuten edellisestä erästä seuraavaan!) pipetillä, sulalla tai vastaavalla. Sekoituksen jälkeen mädit voidaan jättää rauhaan noin 10-15 minuutin ajaksi ennen veden lisäämistä. Mäti voidaan sijoittaa joko heti tämän jälkeen haudontalokerikoihin tai vastaaviin tai se voidaan jättää turpoamaan häiriöttömässä paikassa vähintään 3 tuntia ennen hautoutumaan laittamista. Kunkin perheen sijoituslokeron tms. merkitseminen ja kirjaaminen on luonnollisesti tehtävä huolellisesti.

5.2.2. Siiat

Siian mädin lypsyssä on otettava huomioon mädin jäätymisvaara etenkin, jos joudutaan hoitamaan lypsyt ulkona kuten monesti luonnosta emojen hankittaessa toimitaan.

Sopiva keino estää mädin pinnan jäätyminen pikkupakkasilla on lisätä hedelmöitysluosta lypsyastiaan ja lypsää mäti suoraan siihen. Koska siikakannat ovat usein elinvoimaisia ja emoja on käytössä yli 25 kutuparia, voidaan hedelmöitykset tehdä paritaisina valiten naaraat ja koiraat satunnaisesti. Hedelmöitykset voi varmistaa esim. jakamalla saman naaraan mäti esim. 2-3 osaan, jotka hedelmöitetään eri koirilla. Laitettaessa mäti haudontasuppiloon, voidaan perhekoon tasaaminen hoitaa ottamalla kustakin perheestä sama tilavuus mätiä. Mikäli haudonta on mahdollista perhekohtaisissa suppiloissa, voidaan perheiden alkuvaiheen kuolevuus huomioida ja tasata perhekoko vasta silmäpisteasteelle kehittyneen mädin tasauksilla.

5.2.3. Harjus

Kevätkutuisen harjuksen kanssa on toimittava nopeammin kuin syyskutuisten lohikalojen. Myös mädin lypsyn ajoittamisella on suurempi merkitys. Luonnosta saatuja harjusemoja lypettäessä on muistettava, että ovarionesteen määrä on harjuksilla melko pieni ja silloin mädin pinnan kuivuminen on todellinen vaara jo lyhyenkin säilytyksen aikana. Tavallisesti mädin hedelmöitys kannattakin tehdä suhteellisen pian lypsyn jälkeen. Aurinkoinen, tuulinen kevätpäivä kuivattaa mätiä yllättävän nopeasti.

Harjuksilla on melko hankala ja joskus jopa mahdotonta tehdä täydellisiä hedelmöityksiä (jokainen naaras jokaisella koiralla), koska mäti on erittäin arkaa käsittelylle ja toisaalta koiraiden pienen maitimäärän saaminen kelvollisena säilytykseen ei useinkaan onnistu. Hedelmöitysmalli, johon harjuksilla kuitenkin kannattaa perustamis-hedelmöityksissä pyrkiä on ns. faktoriaalinen malli, missä saman naaraan mäti jaetaan muutamaan osaan (2-5) ja hedelmöitetään eri koirilla. Hedelmöitystä varten kannattaa lypsää ja jakaa muutaman naaraan mäti etukäteen hedelmöityspurkkeihin, joihin lisätään sitten hedelmöitysluosta. Sen jälkeen hedelmöitykset voidaan hoitaa yhdellä koiralla useamman naaraan mätipurkkiin yhdellä käsittelykerralla. Mikäli emokaloja on käytössä yli 25 paria, voidaan toki toimia satunnaisen pareittaisen hedelmöityksen periaatteella, jolloin mädin jakamista ei tarvitse tehdä. Tässäkin tapauksessa saman naaraan mädin puolittaminen ja hedelmöitys eri koirilla voi olla kuitenkin sopiva tapa varmistaa hedelmöityksiä. Perhekohtaisen maitimäärän tasaamisessa voidaan toimia kuten siioillakin.

Kiitokset

Jarmo Makkonen on tehnyt taiton ja muokannut kuvia ja taulukoita. Vesiviljelyn tu-
losyksikön henkilöstö on talven 2001 aikana pidetyissä sisäisissä viljelygenetiikan
koulutustilaisuuksissa antanut arvokkaita kommentteja, joiden mukaan käsikirjoitusta
on voitu muokata ja sopivasti painottaa tärkeiksi katsottuja kohtia. Kiitokset myös
Anssi Laurilalle kommentteista käsikirjoitukseen.

Kirjallisuus

- Aho, T. 1999. Mikrosatelliitti-DNA tutkimustekniikkana. RKTL. Kala- ja riistaraportteja 147: 12-16.
- Aho, T. 2000. Harjukset ja taimenet geenikartalle. RKTL. Kala- ja riistaraportteja 180: 31-36.
- Aho, T. 2001. Siikakantojen geneettisen monimuotoisuuden selvitys mikrosatelliittimenetelmällä. RKTL. Kala- ja riistaraportteja 217: 51-63.
- Björklund, M. & Stone, J. 2001. Delrious: a computer program designed to analyse molecular marker data and calculate delta and relatedness estimates with confidence. *Mol. Ecol. Notes.* 1: 209-212.
- Gharrett, A.J. and Shirley, S.M. 1985. A genetic examination of spawning methodology in a salmon hatchery. *Aquaculture* 47: 245-256.
- Goldstein, D.B. & Schlötterer, C. 1999. *Microsatellites. Evolution and Applications.* Oxford University Press.
- Ewens, W. J. 1972. The sampling theory of selectively 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.
- Juga, J., Maijala, K., Mäki-Tanila, A., Mäntysaari, E., Ojala, M. ja Syväjärvi, J. 1999. Kotieläinjalostus. Suomen Kotieläinjalostusosuuskunta, Gummerus Kirjapaino, Jyväskylä 1999. 294 s.
- Luikart, G., and J.-M. Cornuet. 1998. Empirical Evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology* 12: 228-237.
- 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. RKTL. Kala- ja riistaraportteja 200. 48 s. + liitteet.
- Primmer, C. R., Aho, T., Piironen, J., Estoup, A., Cornuet, J.-M. & Ranta E. 1999. Microsatellite analysis of hatchery stocks and natural populations of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, from the Nordic region: implications for conservation. *Hereditas* 130: 277-289.
- Primmer, C. R., Koskinen, M. & Piironen, J. 2000. The one that did not get away: individual assignment using microsatellite data detects a case of fishing competition fraud. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267: 1699-1704.
- Roff, D. A. 1997. *Evolutionary Quantitative Genetics.* Chapman & Hall.
- Smith, T. B. & Wayne, R. K. (eds.) 1996. *Molecular genetic approaches in conservation.* Oxford University Press.
- Withler, R.E. 1988. Genetic consequences of fertilizing chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) eggs with pooled milt. *Aquaculture* 68: 15-25.

Liite 1. Genetiikan termistöä (kts. Juga ym. 1999)

Alleeli eli samanpaikkainen vastingeeni. Saman geenin vaihtoehtoisia, samassa geenipaikassa (**lokuksesta**) sijaitsevia muotoja, jotka vaikuttavat samaan biokemialliseen prosessiin tai kehitystapahtumaan (paitsi mikrosatelliiteilla!). Populaatiossa saman geenin vaihtoehtoisia alleeleita voi olla jopa kymmeniä erilaisia. Sukusoluissa kustakin geenistä on vain yksi alleeli.

Allotsyymi on elektroforeesilla erotettavissa oleva entsyymien muoto, joka on saman geenipaikan vaihtoehtoisten alleelien tuotetta.

Crossing over eli geenien vaihdunta. Sukusolujen muodostumisvaiheessa vastinkromosomien parituessa tapahtuva *kromatidien* (DNA-juosteiden) osien vaihtuminen, minkä seurauksena alkuperäinen kahdessa tai useammassa lokuksessa ollut geeniyhdistelmä purkautuu ja muodostuu uusi geeniyhdistelmä.

Diploidi Diploidin solun tumassa on kutakin kromosomia kaksi kappaletta (2n), toinen vastinkromosomi on peräisin äidiltä ja toinen isältä.

DNA Neljästä emäksestä (adeniini A, tymiini T, guaniini G ja sytosiini C) sokerimolekyylin ja fosforin välityksellä koostuva kaksoisjuosteinen jättiläismolekyyli, joka muodostaa kaikkien solujen geneettisen materiaalin (geenit). Löytyy solujen tumien kromosomeista.

Domestikaatio Eläinten ja kasvien ominaisuuksien muuttuminen jatkuvan valinnan avulla ihmiselle käyttökelpoisiksi niin, että eläin tai kasvi poikkeaa luonnonvaraisista sukulaisistaan.

Efektiivinen populaatiokoko Ks. Tehollinen populaatiokoko.

Entsyymielektroforeesi on entsyymiproteiinien erottelua sähkökentässä niiden aminohappokoostumuksesta ja ympäristön pH:sta riippuvan sähkövarauksen perusteella, jolloin erilaiset entsyymiproteiinit kulkeutuvat eripituisia matkoja käytetyssä sähkökentässä.

Evoluutio Lajinkehitys. Populaatioiden ja lajien vähittäinen perinnöllinen muuttuminen. Geneettinen (perinnöllinen) muuntelu ja valinta ovat evoluution välttämättömät ehdot.

Fenotyyppi Yksilön havaittavissa oleva ominaisuus tai ulkonäkö. Muodostuu geneettisten tekijöiden ja ympäristötekijöiden vaikutuksista.

Fiksaatio Kun populaatiossa on lokuksessa jäljellä vain yksi alleeli, sen sanotaan fiksoituneen.

F_{ST} -arvo Fiksaatioindeksi, joka mittaa (osa)populaatioiden erilaistumista. Mikäli kaikki populaatiot noudattavat Hardy-Weinbergin lakia täysin samoilla alleelifrekvensseillä, $F_{ST}=0$.

Geeni Perintötekijä. Perinnöllistä ominaisuutta ohjaava DNA-jakso, joka sisältää tiedon valkuaisaineen (tai RNA:n) rakenteesta. Ohjaa solun tai eliön elintoimintoja ja kehitystä.

Geenifrekvenssi alleelin suhteellinen osuus geenilokuksen kaikista alleeleista populaatiossa. Geenifrekvenssit voidaan määrittää genotyyppien yleisyyden perusteella. Geeni- ja genotyyppifrekvenssit pysyvät populaatiossa muuttumattomina tietyin ehdoin (vrt. Hardy-Weinbergin laki).

Geenimuoto ks. alleeli

Geenipaikka ks. lokus

Geenipankki Uhanalaisen kannan perinnöllisen vaihtelun säilyttämiseksi muodostettu elävien yksilöiden (esim. emokalasto) tai pakastettujen alkioiden ja sperman (maitipankki) kokoelma

Geenipooli Saman rodun, populaation tai sen osan geenien elävä yhteisvarasto. Populaation geenistön koostumus tiettyä ajankohtana.

Geneettinen etäisyys Populaatioiden välinen geneettinen 'sukulaisuus'. Mitä enemmän populaatioissa esiintyy samoja alleeleja, sitä pienempi on niiden välinen geneettinen etäisyys.

Geneettinen pullonkaula Populaation efektiivinen koko romahtaa hyvin pieneksi, minkä seurauksena populaation geneettinen monimuotoisuus usein kapenee.

Genomi Eliön perimä. Yksinkertainen eli haploidinen kromosomisto, jossa on lajille tunnusomainen määrä kromosomeja geeneineen. Yleiskielessä perimällä tarkoitetaan usein yksilön geenien kokonaisuutta.

Genotyyppi Yksilön äidiltään ja isältään saamien alleelien yhdistelmä yhdessä tai useammassa lokuksessa.

Haploidi Haploidissa solussa, sukusoluissa, kromosomisto on yksinkertaisena (n)

Hardy-Weinbergin laki Populaatiogenetiikan peruslaki, jonka mukaan geeni- ja genotyyppifrekvenssit pysyvät populaatiossa muuttumattomina, mikäli eläinten parituminen on satunnaista, eli muita geenifrekvenssien muutoksiin vaikuttavia tekijöitä (mutaatio, migraatio, valinta tai satunnaisajautuminen) ei ole.

Heterotsygootti Eriperintäinen solu tai yksilö, jonka diploidisessa kromosomistossa vastingeenit ovat eri alleeleja.

Homotsygootti Samaperintäinen solu tai yksilö, jonka diploidissa kromosomistossa vastingeenit ovat samoja alleeleja.

Kromosomi Solun tumassa oleva DNA:sta ja proteiineista muodostuva kappale, joka sisältää perintöaineksen eli geenit. Lukumäärä ja muoto ovat lajille tyypillisiä.

Kvalitatiivinen ominaisuus Yksinkertaisesti periytyvä ominaisuus, joka ilmenee eläimillä siten, että ne voidaan jakaa selkeästi rajattuihin luokkiin, esimerkiksi värityypit.

Kvantitatiivinen ominaisuus Ominaisuus, jonka arvot vaihtelevat liukuvasti johtuen useiden ominaisuuteen vaikuttavien lokusten muuntelusta sekä ympäristötekijöiden vaikutuksesta.

Letaalitekijä Geeni- tai kromosomimutaatio, joka aiheuttaa yksilön kuoleman ennen syntymää tai pian syntymän jälkeen. Yksilö voi olla resessiivinen letaalitekijän kantaja, jolloin ominaisuus ei ilmene heterotsygooteissa yksilöissä.

Lokus Geenin sijaintipaikka kromosomissa (geenipaikka).

Meioosi Sukusolujen muodostumistapahtuma.

Migraatio Muutto, populaation yksilöiden elinalueen vaihdos, joka merkitsee geneettisen materiaalin siirtymistä populaatiosta toiseen. Voi aiheuttaa merkittäviä muutoksia populaatioiden geenifrekvensseihin.

Mikrosatelliitti Geenikartoituksessa käytetty geenimerkki. Sitä vastaavan DNA-alueen muuntelu perustuu 1-5 emäksen mittaisen ydinjakson vaihtelevalukuisen peräkkäiseen toistumiseen. Lokuksessa olevat erilaiset alleelit sisältävät eri määrän ydinjakson toistumia.

Minisatelliitti Minisatelliitti sisältää samanlaisia toistoja kuin mikrosatelliitti, mutta ydinjakso on pitempi, 10-100 emästä. Minisatelliitit ovat enimmäkseen kromosomien päissä. Eri minisatelliittilokusten kokonaisvaihtelu antaa yksilöllisen DNA-sormenjäljen.

Mitokondrio ja mitokondrio-DNA (mt-DNA) Mitokondriot ovat solujen energiantuotantoon erikoistuneita soluelimiä, jotka periytyvät ainoastaan naaraan munasolujen välityksellä. Mitokondrioissa on omaa DNA:a tavallisesti rengasmaisena rakenteena.

Monimuotoisuus eli biodiversiteetti. Käsittää lajinsisäisen perinnöllisen muuntelun, lajien runsauden ja niiden elinympäristöjen monipuolisuuden.

Mutaatio Itsestään syntynyt tai keinotekoisesti aiheutettu pysyvä muutos perintöaineksessa. On tärkein muuntelua lisäävistä voimista. Erotetaan kromosomisto-, kromosomi- ja geenimutaatiot.

Perinnöllinen muuntelu eli geneettinen muuntelu. Perintötekijöistä eli geeneistä ja geeniyhdistelmistä johtuva yksilöiden erilaisuus. Muuntelua ylläpitävät rekombinaatio ja mutaatiot.

Perinnöllisyys Sukulaisyksilöt muistuttavat enemmän toisiaan kuin populaation yksilöt keskimäärin.

Perustajayksilöt Populaation (tai esimerkiksi emoparven) alkuperäiset 'äidit ja isät'.

Populaatio Samaan aikaan samalla alueella elävä samaan lajiin kuuluvien yksilöiden joukko.

Rekombinaatio Uudelleen yhdistyminen. Eri lokuksissa olevien alleelien ryhmittymisen sattumanvaraisesti uudelleen sukusolujen muodostumisen ja hedelmöittymisen seurauksena.

Resessiivinen periytyminen Väistyvä tai peittyvä periytyminen. Resessiivinen ominaisuus ilmenee vain, jos yksilö on perinyt ominaisuuteen vaikuttavan resessiivisen alleelin kummaltakin vanhemmaltaan.

Satunnaisajautuminen Sattuman vaikutus geenien jakautumisessa. Merkitys voi pienissä populaatioissa olla huomattava.

Sukulaisuusaste r Yksilöiden välisen sukulaisuuden astetta kuvaava suure, joka voidaan laskea yksilöiden jakamien alleelien ja koko populaation alleelifrekvenssien perusteella. r -arvo kertoo kuinka suuri osa kahden yksilön geeneistä on keskimäärin samoja.

Sukupolvien välinen aika Vanhempien keskimääräinen ikä jälkeläisten syntyessä.

Sukupuuhedelmöitys (pedigreed mating). Hedelmöitystapa, missä kultakin parituksessa käytettävältä naaraalta jää vakiomäärä tyttäriä ja kultakin koiraalta sama vakiomäärä poikia seuraavaan sukupolveen.

Sukusiitos Lähisukuisten yksilöiden paritus eli paritettavat yksilöt ovat keskenään enemmän sukua kuin yksilöt populaatiossa keskimäärin.

Sukusiitosaste Todennäköisyys, että eläimen satunnaisen lokuksen molemmat alleelit ovat peräisin samalta esivanhemmalta. Toisella tavalla sanottuna, sukusiitosaste ilmaisee edellä mainitunlaisten lokusten todennäköisyyden suhteellisen osuuden yksilön genotyypissä.

Sukusiitostaantuma lähisukuisten yksilöiden parituksesta johtuva homotsygotiaasteen nousu ja siitä aiheutuva, erityisesti elinvoima- ja hedelmällisyysominaisuuksissa todettu taantuma. Johtuu resessiivisten geenivaikutusten ilmenemisestä.

Tehollinen populaatiokoko (efektiivinen populaatiokoko) tehollinen populaatiokoko määräytyy ja lasketaan vanhempaisyksilöiden, siis äitien ja isien, lukumäärästä.

Liite 2. Aiheeseen liittyvä keskeinen kirjallisuus

- Aho, T. 2001a. Raatejoen taimenten geneettinen analyysi. Loppuraportti Metsähallitukselle. 3 s.
- Aho, T. 2001b. Siikakantojen geneettisen monimuotoisuuden selvitys mikrosatelliittimenetelmällä. RKTL. Kala- ja riistaraportteja 217: 51-63.
- Aho, T. 2001c. Microsatellite analysis of vendace (*Coregonus albula*) populations in lakes Höytiäinen and Suvasvesi. Loppuraportti Joensuun yliopistolle. 2 s.
- Aho, T., Piironen, J., Ranta E. & Primmer, C. R. 1998. Microsatellites for assessment of genetic variation and improvement of hatchery practises in endangered salmonids. Paper in ICES Annual Science Conference, Cascais, Portugal, September 1998.
- Aspi, J., Kuusipalo, L., Huusko, A. & Pasanen, P. 1999. Miten Kuusamon taimenkantoja olisi hoidettava? Teoksessa: Heinimaa, P. & Manninen, K. (toim.). Vesiviljelyn kalakantojen monimuotoisuuden merkitys istutushoidossa. Riista- ja Kalatalouden tutkimuslaitoksen XXIII vesiviljelypäivät. RKTL. Kala- ja riistaraportteja 147: 26-31.
- Dahlström, H., Eloranta, A., Lehtonen, H., Soveri, U.-R., Toivonen, H., Torvinen, R., Uusimäki, M., Westman, K., Vuolanto, S. & Saura, A. 1996. Kalaston suojelutyöryhmän muistio. Työryhmämuistio MMM 1996:19. 65 s. Maa- ja metsätalousministeriö, Helsinki.
- Elo, K. 1988. Lohen (*Salmo salar* L.) entsyymigeneettinen muuntelu Näätämöjoen ja Tenojoen vesistöissä. Turun yliopisto, Biologian laitos. Pro gradu-tutkielma perinnöllisyystieteessä. 62 s.
- Elo, K. 1993. Gene flow and conservation of genetic variation in andromous Atlantic salmon (*Salmo salar*). Hereditas 119: 149-159.
- Elo, K., Erkinaro, J., Vuorinen, J. & Niemelä, E. 1995. Hybridization between Atlantic salmon (*Salmo salar*) and brown trout (*S. trutta*) in the Teno and Näätämö river systems, northernmost Europe. Nord. J. Freshwat. Res. 70: 56-61.
- Elo, K., Vuorinen, J.A. & Niemelä, E. 1994. Genetic resources of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Teno and Näätämö rivers, northernmost Europe. Hereditas 120: 19-28.
- Eskelinen, U., Pursiainen, M. & Rahkonen, R. 1991 (toim.). Valtion kalanviljelyn XIII neuvottelupäivät. Uhanalaisten arvokalalajien ja -kantojen säilyttäminen: tavoitteet ja keinot. RKTL. Kalatutkimuksia - Fiskundersökningar 31. 74 s.
- Heinimaa, P. & Juntunen, K. 1995 (toim.). Valtion kalanviljelyn XIX neuvottelupäivät. Kalakantojen monimuotoisuuden hoito. RKTL. Kalatutkimuksia - Fiskundersökningar 96. 40 s.
- Heinonen, M. 1987. Suur-Saimaan siikojen taksonomia ja geneettinen muuntelu. RKTL. Monistettuja julkaisuja 59. 88 s.
- Ikonen, E., Jutila, E., Koljonen, M-L., Pruuki, V. & Romakkaniemi, A. 1986. Tornionjoen vesistön meritaimenkantojen tila, geneettiset erot ja viljelytarpeet. RKTL. Monistettuja julkaisuja 57. 103 s.
- Jutila, E., Ahvonen, A., Laamanen, M. & Koskiniemi, J. 1998. Adverse impact of forestry on fish and fisheries in stream environments of the Isojoki basin, western Finland. Boreal Environ. Res. 3: 395-404.
- Kallio-Nyberg, I., Koljonen, M-L. & Jutila, E. 2001. Taimenatlas. RKTL. Kalatutkimuksia – Fiskundersökningar 173. 57 s.
- Kilpinen, K. 1988. Eräiden harjuskantojen entsyymigeneettinen selvitys. Kalatalouden keskusliitto. Moniste 3/1988. 25 s.

- Koljonen, M-L. 1985a. Suomen lohikantojen entsyymigeneettinen muuntelu. RKTL. Monistettuja julkaisuja 37. 94 s.
- Koljonen, M-L. 1985b. Kirjallinen tiedonanto. Taimenajojen tähänastiset tulokset. Laukaan keskuskalanviljelylaitos. Moniste. 6 s.
- Koljonen, M-L. 1989a. Electrophoretically detectable genetic variation in natural and hatchery stocks of Atlantic salmon in Finland. *Hereditas* 110: 23-35.
- Koljonen, M-L. 1989b. Uudenmaan meritaimenkantojen geneettinen tutkimus. Suomen Kalastuslehti 96: 128-131.
- Koljonen, M-L. 1991. Kirjallinen tiedonanto. Alleelifrekvenssivertailu Rautalammin reitin järvitaimenkantojen välillä. Laukaan keskuskalanviljelylaitos. Moniste. 1 s.
- Koljonen, M-L. 1999. Genetic structure of Atlantic salmon in the Baltic Sea, stock mixture analysis and conservation strategies. PhD-thesis from the Department of Biosciences, Division of Genetics, University of Helsinki and Finnish Game and Fisheries Research Institute.
- Koljonen, M-L., Jansson, H., Paaver, T., Vasin, O. & Koskiniemi, J. 1999. Phylogeographic lineages and differentiation pattern of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in the Baltic Sea with management implications. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56: 1766-1780.
- Koljonen, M-L. & Huusko, A. 1993. Genetic variation of brown trout in the Koutajoki river system. *Oulanka Reports* 12: 129-132.
- Koljonen, M-L., Koskiniemi, J. & Pasanen, P. 1988. Electrophoretic markers for the whitefish species pair *Coregonus pallasii* and *Coregonus peled*. *Aquaculture* 74: 217-226.
- Koljonen, M-L. & McKinnell, S. 1996. Assessing seasonal changes in stock composition of Atlantic salmon catches in the Baltic Sea with genetic stock identification. *J. Fish Biol.* 49: 998-1018.
- Koljonen, M-L. & Pella, J.J. 1997. The advantage of using smolt age with allozymes for assessing wild stock contributions to Atlantic salmon catches in the Baltic sea. *ICES Journal of Marine Science* 54: 1015-1030.
- Koljonen, M-L. & Sarjamo H. 1987. Paatsjoen vesistön taimenkantojen geneettinen tutkimus. Suomen Kalastuslehti 94(8): 428-431.
- Koskinen, M., Ranta, E., Piironen, J., Veselov, A., Titov, S., Haugen, T.O., Nilsson, J., Carlstein, M. & Primmer, C.R. 2000. Genetic lineages and postglacial colonization of grayling (*Thymallus thymallus*, Salmonidae) in Europe, as revealed by mitochondrial DNA analysis. *Mol. Ecol.* 9: 1609-1624.
- Koskiniemi, J. 1991. Kolmen LKKVL:n rautalammissen taimennäytteen (Siikakoski, Äyskoski ja Simunankoski) entsyymigeneettinen muuntelu. RKTL. Muistio. 5 s.
- Koskiniemi, J. 1995. Kainuun kv:n toimittamien näytteiden (Kajaaninjoen harjus sekä Kongasjoen ja Montan järvitaimen) entsyymigeneettinen analyysi, tulokset. RKTL. Muistio. 19 s.
- Koskiniemi, J. 1996. Lohen emokalastojen monimuotoisuuden kartoitus – väliraportti 1996. RKTL. Moniste. 5 s. + liitteet.
- Koskiniemi, J. 2000. Hiitolanjoen, Imatran puron sekä Saarasjärvenojan, Virojoen, Vehkajoen ja Summanjoen taimennäytteiden entsyymigeneettinen analysointi. Helsinki, Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos. Muistio. 13 s.
- Koskiniemi, J. & Kilpinen, K. 1987. Harjuskantojen perinnöllisten erojen selvitys. Suomen Kalastuslehti 94: 424-427.

- Lahti, K. 2001. Integrated analysis of aggression in salmonids. PhD-thesis from the Department of Ecology and Systematics, Division of Population Biology, University of Helsinki.
- Lempinen, P. 2001. Suomenlahden meritaimenkantojen suojele- ja käyttösuunnitelma. Kala- ja riistahallinnon julkaisuja 52. 142 s.
- Makkonen, J. 1997 (toim.). Saimaan nieriä, syvien vesien uhanalainen. RKTL. Kalatutkimuksia - Fiskundersökningar 133. 129 s.
- Makkonen, J. & Pursiainen, M. 1996 (toim.). Valtion kalanviljelyn XX neuvottelupäivät "Istutuspoikasten elinkaari - mätimunasta saaliiksi". Kuopio 10.-11.4.1996. RKTL. Kalatutkimuksia - Fiskundersökningar 110. 103 s.
- Makkonen, J., Piironen, J. & Pursiainen, M. 1996. Järvilohen säilyttäminen Vuoksen vesistöalueella. Hoitotoimien ja kalastuksen yhteensovittamista. Apaja 2/1996: 12-13.
- 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. RKTL. Kala- ja riistaraportteja 200. 48 s. + 3 liitettä (108 s.).
- Partti-Pellinen, K.A., Elo, K., Palva, T. K., Tuunainen, P. & Hakumäki, M.O.K. 1991. Mitochondrial DNA variation of *Salvelinus* species found in Finland. J. Fish Biol. 39 (Suppl. A): 87-92.
- Partti-Pellinen, K.A., Elo, K., Palva, T. K., Tuunainen, P. & Hakumäki, M.O.K. 1992. Restriction fragment length polymorphism in mitochondrial DNA of stocks of *Coregonus* in Finland. Biology and Management of Coregonid Fishes 1990. Polskie Archiwum Hydrobiologii 39: 541-549.
- Partti-Pellinen, K., Takkunen, T. & Hakumäki M. 1993. Voidaanko taimenen kutukuopista saaduista mätimunista selvittää mitokondrioDNA-tyyppi restriktioanalyysillä? Suomen Kalatalous 59: 33-36.
- Pennanen, J.T. 1988. Kokemäenjoen vesistön toutaimen hoito- ja suojeleohjelma. RKTL. Monistettuja julkaisuja 60. 56 s.
- Perosvuo, M. 1987. Geneettiset tutkimukset: mtDNA-analyysi. Rautalammin reitin taimenprojekti, vuosiraportti 1987. Kuopion yliopisto. Moniste. 11 s.
- Piironen, J., Aho, T., Primmer, C. R. & Ranta E. 1998. What do DNA-analyses tell about the biodiversity of landlocked salmon. - Publications of Karelian Institute, University of Joensuu 122: 131-136.
- Primmer, C.R., Aho, T., Piironen, J., Estoup, A., Cornuet, J-M. & Ranta, E. 1999. Microsatellite analysis of hatchery stocks and natural populations of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, from the Nordic region: implications for conservation. Hereditas 130: 277-289.
- Primmer, C.R., Huttula, E., Särkisaari, P., Huusko, A., Piironen, J. & Ranta, E. 2000b. Posion Karhunpesälammesta uusi kanta nieriäkartalle? Genetic characterisation of a potentially new population of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, from the Posio region. Teoksessa: Makkonen, J. (toim.). Veden satoa 2000. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen XXIV vesiviljelypäivät. RKTL. Kala- ja riistaraportteja 180: 37-38.
- Primmer, C.R., Koskinen, M. T. & Piironen, J. 2000a. The one that did not get away: individual assignment using microsatellite data detects a case of fishing competition fraud. Proc. R. Soc. Lond. B 267: 1699-1704.

- Pursiainen, M., Makkonen, J. & Piironen, J. 1998. Maintenance and exploitation of landlocked salmon *Salmo salar* m. *sebago*, in the Vuoksi Watercourse. In: Cowx, I.G. (ed.). Stocking and introduction of fish. Fishing News Books: 46-58. MPG Books Ltd, Bodmin, Cornwall.
- Reist, J. D., Maiers, L.D., Bodaly, R.A., Vuorinen, J. & Carmichael, T.J. 1998. The phylogeny of new- and old-world coregonine fishes as revealed by sequence variation in a portion of the d-loop of mitochondrial DNA. Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol. 50: 323-339.
- Ruohonen, K., & Ruuhijärvi, J. 1993 (toim.). Valtion kalanviljelyn XVII neuvottelupäivät 31.3.-1.4.1993, Tampere. Märintuotanto ja emokalojen viljely. RKTL. Kalatutkimuksia - Fiskundersökningar 60. 103 s.
- Ståhl, G. 1983. Differences in the amount and distribution of genetic variation between natural populations and hatchery stocks of Atlantic salmon. Aquaculture 33: 23-32.
- Svärdson, G. 1998. Postglacial dispersal and reticulate evolution of Nordic coregonids. Nord. J. Freshwat. Res. 74: 3-32.
- Thorpe, J. E. 1999. Evaluation of fish cultivation methods in the northern aquaculture stations of the Finnish Game and Fisheries Research Institute. RKTL. Kala- ja riistaraportteja 164. 44 s.
- Voutilainen, M. 1988. Geneettiset tutkimukset: mtDNA-analyysi. Rautalammin reitin taimenprojekti, vuosiraportti 1988. Kuopion yliopisto. Moniste. 7 s.
- Vuorinen, J. 1984. Reduction of genetic variability in a hatchery stock of brown trout, *Salmo trutta* L. J. Fish. Biol. 24: 339-348.
- Vuorinen, J. 1988. Enzyme genes as interspecific hybridization probes in Coregoninae fishes. Finnish Fisheries Research 9: 31-37.
- Vuorinen, J., Himberg, M. & Lankinen, P. 1981. Genetic differentiation in *Coregonus albula* (L.) (Salmonidae) populations in Finland. Hereditas 94: 113-121.
- Vuorinen, J. & Piironen, J. 1984. Inheritance and joint segregation of biochemical loci in European whitefish, genus *Coregonus*. Hereditas 101: 97-102.
- Westman, K. 1997. Uhanalaisten kalojen säilyttäminen. Teoksessa: Simola, H. (toim.). Valtion kalanviljelyn XXI neuvottelupäivät, Viljely-ympäristön säätely, Rovaniemi 9.-10.4.1997. RKTL. Kala- ja riistaraportteja 103:14-28.
- Westman, K. 1999. Kalojen monimuotoisuus viljelytoiminnan haasteena. - Teoksessa: Heinimaa, P. & K. Manninen (toim.). Vesiviljely ja kalakantojen monimuotoisuuden merkitys istutushoidossa. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen XXIII Vesiviljelypäivät. RKTL. Kala- ja riistaraportteja 147:1-11.