

Jarmo Koskiniemi
Maataloustieteiden laitos
Helsingin yliopisto
0504151624
jarmo.koskiniemi@helsinki.fi

03.12.2015

Kolkunjoen taimenten geneettinen analyysi

Näytteet

Mika Oraluoma (Vesi-Visio osk) toimitti 17.9.2015 Helsingin yliopiston maataloustieteiden laitoksen ja Luke:n genotyypityslaboratorioon 14 taimennäytettä Kolkunjoelta (Taulukko 1). Tarkoituksena oli selvittää taimenkannan geneettistä rakennetta, kuten muuntelun määrää ja erilaistumista.

Laboratorioanalyysit, vertailunäytteet ja tilastolliset menetelmät

Näytteet analysoitiin samalla tavoin kuin laboratoriossa on aikaisemminkin analysoitu taimennäytteitä:

- DNA eristettiin tehtiin Qiagen Blood&Tissue kitillä (linkki:[Qiagen](#)). DNA:ta saatiin 400 mikrolitraa (konsentraatio n. 50-100 ng/mikrolitra). Analyysissä käytettiin n. 10 mikrolitraa DNA:ta ja loput säilöttiin laboratorion DNA-varastoon. Eristyksestä jäljelle jääneitä eväpaloja säilytetään laboratorion varastossa, mutta näytteet hävitetään, kun säilytystila tarvitaan uudemmille näytteille.
- PCR tehtiin Qiagen Type-it pcr-kitillä (linkki:[Qiagen](#)).
- PCR-reaktiot analysoitiin Abi 3130 -kapillaarielektroforeesilaitteella (linkki:[Abi](#)). Genotyypitys tehtiin analysoimalla elektroforeesilaitteen raakadata GeneMapper5 -ohjelmistolla (linkki:[Genemapper](#)).
- Genotyyppi koostui 16 mikrosatelliittilokuksesta: BS131, OneU9, Ssa197, Ssa289, Ssa407, Ssa85, SSosl311, SSosl417, SSosl438, SSsp1605, SSsp2201, Str15INRA, Str60INRA, Str73INRA, Str85INRA ja Strutta58.

Vertailuaineistoksi otettiin aikaisemmin Keski-Suomen alueelta tutkitut taimenkannat (Raportti 'Keuruun ja Multian taimenkannan geneettinen analyysi 9.3.2015', saatavissa esimerkiksi Jarmo Koskiniemeltä):

Multian Saikanjoki
Multian Hännättömänjoki
Keuruun Asunnanjoki
Muuramenjoki
Konneveden Siikakoski ja Kellankoski
Pielaveden Koivujoki
Joutsan Rutajoki
Saarijärven Peltojoki
Moksinjoki
Pirkanmaa (sekanäyte, jossa eri puolilta Pirkanmaata olevia kaloja)

Isojoki, Luutajoki ja Rautalamminreitti (yleiset istutuskannat)

Genotyypiaineisto analysoitiin tilastollisesti:

- kantojen geneettiset etäisyydet (Nei et. al. -84) laskettiin Populations 1.2.32 -ohjelmalla (linkki:[Populations](#)). Geneettinen etäisyys vaihtelee välillä 0-1.
- hierarkkinen puurakenne (dendrogrammi) laskettiin Populations 1.2.32 -ohjelmalla ja piirrettiin Treeview -ohjelmalla (linkki:[Treeview](#)). Dendrogrammi kuvaa graafisesti kantojen geneettiset etäisyydet niin, että geneettisesti samankaltaiset kannat ryhmittyvät puurakenteessa samaan haaraan.
- kantojen geneettisten erojen tilastollinen merkitsevyys testattiin Fstat 2.9.3.2 -ohjelmalla (linkki:[Fstat](#)).
- kantojen geenidiversiteetti (heterotsygotia-aste) sekä havaitut alleelimäärät ja alleelirikkaudet laskettiin Fstat 2.9.3.2. -ohjelmalla. Geenidiversiteetti ja alleelimäärät mittaavat kantojen geneettisen muuntelun määrää. Geenidiversiteetti vaihtelee välillä 0-1, ja alleelimäärä voi periaatteessa olla miten iso tahansa. Alleelirikkaus on otoskokojen (tutkittujen kalamäärien) erojen vaikutusta tasaava alleelimäärän mitta.
- kantojen efektiiviset koot määritettiin Colony 2.0.5.9. -ohjelmalla (linkki: [Colony](#)). Ohjelma arvioi kullekin kannalle kalojen sukulaisuudet ja perherakenteen, ja sen perusteella geneettisesti 'tehollisen' populaatiokoon, joka riippuu siitä, miten kannan koko on vaihdellut ja miten iso osa kannan kaloista todellisuudessa on lisääntynyt kussakin sukupolvessa, ja miten paljon emojen jälkeläismäärät ovat vaihdelleet.
- kantojen privaattialleelit (vain yhdessä vertailussa mukana olevassa kannassa esiintyvät geenimuodot) etsittiin GenAEx 6.5. -ohjelmalla (linkki:[GenAEx](#)). Privaattialleeli ei tarkoita, että kyseistä alleelia ei voisi esiintyä jossain vertailuun kuulumattomassa kannassa.
- individual assignment -testit tehtiin GeneClass2 -ohjelmalla (linkki:[GeneClass](#)). IA-testeissä kullekin kallekin kalalle etsittiin kanta, johon se genotyypinsä perusteella parhaiten sopi. Vertailuaineistona kullekin kalalle käytettiin koko aineistoa niin, että testattava kala poistettiin vertailuaineistosta, jotta välttyttiin vertaamasta kalaa itseensä.
- kalojen sukulaisuudet laskettiin Coancestry 1.0.1.5. -ohjelmalla (linkki:[Coancestry](#)). Ohjelman laskemista 7 estimaattorista valittiin TrioML. Tämä vaihtelee välillä 0-1 niin, että n. 0,5 on täyssisarten ja vanhempien ja jälkeläisten välinen sukulaisuus ja 0,25 puolisisarten välinen sukulaisuus. Vahvasti sukusiitteisissä populaatioissa sukulaisuus voi olla yli 0,5.

Tulokset

Kolkunjoen 14 kalan näyte oli varsin pieni (Taulukko 2), mikä tuo tuloksiin jonkin verran epävarmuutta. Yleinen nyrkkisääntö populaatiogeneettisissä tutkimuksissa on, että näytekoon pitäisi olla n. 50, jotta geneettistä rakennetta kuvaavat indeksit olisivat luotettavia. Kaloja oli kahdelta eri alueelta joesta (Taulukko 1), mutta pienistä otosko'oista johtuen Kolkunjoen kalat käsiteltiin yhtenä näytteenä ryhmittelyanalyysissä ja laskettaessa geneettisiä etäisyyksiä ja geneettisen muuntelun mittoja.

Kolkunjoen kalojen sukulaisuudet olivat varsin korkeita (Taulukot 6 ja 7). Sekä Kuorikosken että Särkikosken kalojen välillä havaittiin runsaasti täyssisartasoisia (>0,4) sukulaisuuksia, ja varsin runsaasti puolisisartasoisia sukulaisuuksia (n. 0,2-0,4). Puolisisaruuksia havaittiin

myös eri koskien välillä. Keskimääräinen sukulaisuus (Taulukko 7) oli Kolkunjoessa 0,21, mikä oli myös lähes puolisisartasoinen ja hieman vertailuaineiston keskimääräisiä sukulaisuuksia isompi.

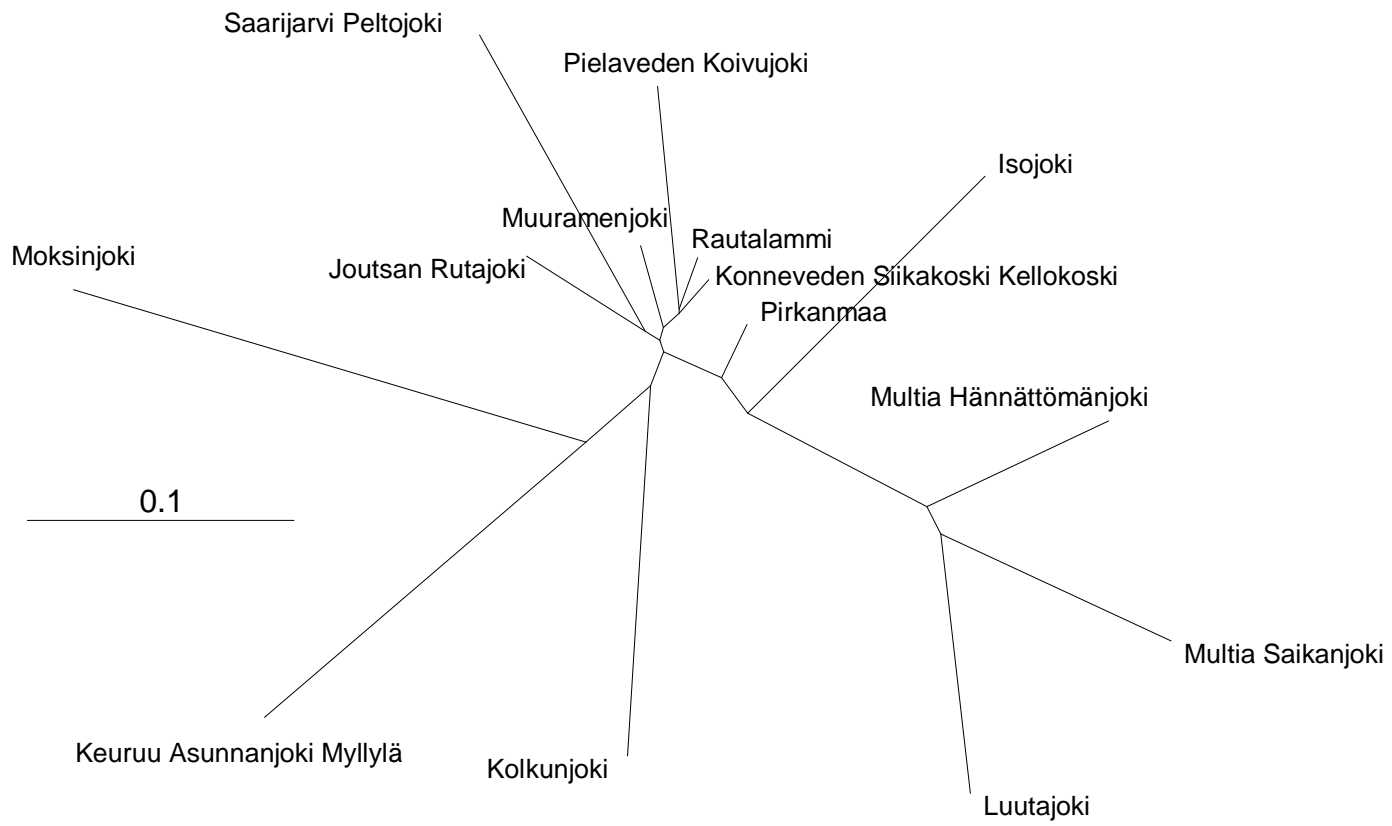
Kolkunjoen efektiivinen populaatiokoko (Taulukko 2) oli 8 (4-23), mikä oli koko aineiston toiseksi pienin ja huomattavasti koko aineiston keskiarvoa (35,6) pienempi. Pieni efektiivinen koko tarkoittaa joko pientä perustajamäärää, kannan koon suuria vaihteluita eri sukupolvissa tai suuria eroja eri kalojen jälkeläismäärässä, tai useaa näistä kolmesta. Tulos on yhteneväinen korkeahkon sukulaisuusasteen kanssa, koska efektiivisen koon pienuuteen vaikuttavat tekijät myös kasvattavat kannan sukulaisuusastetta.

Kolkunjoen geenidiversiteetti (0,62, Taulukko 2) on koko aineiston (0,61) tasolla. Myös alleelirikkaus (4,1) on lähellä koko aineiston keskiarvoa (4,8). Havaittu alleelimäärä (4,2) on selvästi keskiarvoa (6,2) pienempi, mutta tulos johtunee pienestä otoskoosta – isommissa otoksissa havaitaan aina enemmän alleeleita kuin pienemmissä. Tulos on hieman yllättävä, koska pieni efektiivinen koko yleensä indikoi myös pientä geenidiversiteettiä ja alleelirikkausta. Geenidiversiteetin ja alleelirikkauden perusteella Kolkunjoen kanta näyttää geneettisesti vahvemmalta kuin pelkän efektiivisen koon ja sukulaisuusasteen perusteella.

Kolkunjoen geneettiset etäisyydet (Taulukko 3) muihin kantoihin olivat varsin korkeita (keskimäärin 0,28, välillä 0,17-0,41). Kaikki ero olivat tilastollisesti erittäin merkitseviä. Keskimääräinen ero muihin oli suurempi kuin kaikkien kantojen erojen keskiarvo (0,25). Ryhmittelyanalyysissä (dendrogrammi, kuva 1.) Kolkunjoki ryhmittyy samaan haaraan Moksintojen ja Keuruun Asunnanjoen kanssa, mutta erot näihinkin ovat varsin isoja. Sekä geneettisten etäisyyksien että ryhmittelyanalyysin perusteella Kolkunjoki näyttäisi olevan geneettisesti varsin kaukana kaikista vertailukannoista.

Individual assignment –testi (Taulukko 5.) on yhdensuuntainen etäisyyksien antaman tuloksen kanssa. Kaikki Kolkunjoen kalat ryhmittyvät selvästi omaan kantaan. Kolkunjoessa havaittiin kaksi privaattialleelia (Taulukko 4.), molemmat tosin samassa lokuksessa (SSa289).

Johtopäätöksenä on, että Kolkunjoen taimenkanta poikkeaa selvästi kaikista tässä vertailussa olleista muista kannoista, niin yleisistä viljely- ja istutuskannoista kuin vertailussa olleista muista luonnonkannoista. Vaikka kannan efektiivinen koko oli varsin pieni, olivat kannan geneettisen muuntelun määrää mittaavat geenidiversiteetti ja alleelirikkaus kuitenkin varsin korkeita. Geneettinen muuntelu on perusta kannan elinvoimaisuudelle ja sopeutumiskyvylle muuttuviinkin olosuhteisiin.



Kuva 1. Dendrogrammi. Etäisyyksien mittakaava kuvassa vasemmalla (0.1)

Taulukko 1. Kolkunjoen 2015 taimennäytteet

<u>NäyteNro</u>	<u>Kalan pituus (mm)</u>	<u>Pyyntipaikka</u>
1	165	Kuorikoski (alempi)
2	188	Kuorikoski (ylempi)
3	158	Kuorikoski (ylempi)
4	287	Kuorikoski (ylempi)
5	250	Kuorikoski (ylempi)
6	172	Kuorikoski (ylempi)
8	148	Kuorikoski (ylempi)
9	204	Kuorikoski (ylempi)
10	199	Kuorikoski (ylempi)
11	208	Kuorikoski (ylempi)
12	264	Särkikoski
13	228	Särkikoski
14	232	Särkikoski
15	228	Särkikoski

**Taulukko 2. Näytekoot (N),
geenidiversiteetit (H), havaitut alleelimäärät (Nall),
alleelirikkaudet (R) sekä
efektiiviset populaatiokoot (Ne, suluissa 95%
luotettavuusväli).**

	<u>N</u>	<u>H</u>	<u>Nall</u>	<u>R</u>	<u>Ne</u>
Multia_Saikanjoki	22	0,64	4,6	4,2	24 (13-47)
Multia_Hännättömänjoki	26	0,64	5,1	4,6	15 (8-31)
Keuruu_Asunnanjoki_Myllylä	12	0,42	2,9	2,9	19 (9-62)
Muuramenjoki	50	0,64	8,6	5,9	40 (25-64)
Konneveden_Siikakoski_Kellokoski	47	0,63	7,9	5,6	61 (41-93)
Pielaveden_Koivujoki	104	0,63	6,4	4,6	27 (14-47)
Joutsan_Rutajoki	52	0,66	8,4	6,1	43 (28-72)
Saarijarvi_Peltojoki	15	0,61	4,8	4,5	7 (4-21)
Luutajoki	40	0,58	5,1	4,2	42 (26-70)
Isojoki	50	0,67	8,1	5,8	61 (42-94)
Rautalammi	50	0,64	8,6	5,8	73 (49-108)
Moksinjoki	15	0,40	2,3	2,2	18 (9-42)
Pirkanmaa	50	0,70	9,7	6,6	61 (41-97)
Kolkunjoki	14	0,62	4,2	4,1	8 (4-23)
Keskiarvo	39,1	0,61	6,2	4,8	35,6
Minimi	12	0,40	2,3	2,2	7,0
Maksimi	104	0,70	9,7	6,6	73,0

Taulukko 4. Privaattialleelien määrät ja frekvenssit

	<u>Priv. alleelien määrä</u>
Multia_Saikanjoki	0
Multia_Hännättömänjoki	0
Keuruu_Asunnanjoki_Myllylä	1
Muuramenjoki	5
Konneveden_Siikakoski_Kellokoski	1
Pielaveden_Koivujoki	2
Joutsan_Rutajoki	3
Saarijarvi_Peltojoki	0
Luutajoki	5
Isojoki	7
Rautalammi	5
Moksinjoki	0
Pirkanmaa	5
Kolkunjoki	2
Keskiarvo	2,6

Taulukko 6. Kolkunjoen kalojen sukulaisuudet

0,2 - 0,4

>0,4

	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	13	14	15	
1															1 Kuorikoski (alempi)
2	0,11														2 Kuorikoski (ylempi)
3	0,03	0,29													3 Kuorikoski (ylempi)
4	0,17	0,30	0,11												4 Kuorikoski (ylempi)
5	0,04	0,41	0,29	0,08											5 Kuorikoski (ylempi)
6	0,25	0,45	0,41	0,20	0,19										6 Kuorikoski (ylempi)
8	0,46	0,49	0,03	0,26	0,41	0,47									8 Kuorikoski (ylempi)
9	0,00	0,40	0,30	0,21	0,25	0,34	0,31								9 Kuorikoski (ylempi)
10	0,15	0,32	0,10	0,33	0,17	0,05	0,32	0,25							10 Kuorikoski (ylempi)
11	0,00	0,46	0,43	0,02	0,20	0,36	0,16	0,56	0,32						11 Kuorikoski (ylempi)
12	0,16	0,13	0,07	0,06	0,06	0,07	0,15	0,07	0,23	0,08					12 Särkikoski
13	0,21	0,11	0,11	0,30	0,14	0,08	0,16	0,09	0,10	0,05	0,16				13 Särkikoski
14	0,00	0,20	0,04	0,04	0,18	0,03	0,07	0,20	0,06	0,18	0,31	0,59			14 Särkikoski
15	0,09	0,16	0,01	0,12	0,13	0,15	0,33	0,20	0,25	0,07	0,66	0,25	0,43		15 Särkikoski

Taulukko 7. Sukulaisuudet (keskiarvo, minimi ja maksimi kussakin kannassa)

	<u>Ka</u>	<u>Min</u>	<u>Max</u>
Multia_Saikanjoki	0,23	0,00	0,60
Multia_Hännättömänjoki	0,20	0,00	0,79
Keuruu_Asunnanjoki_Myllylä	0,42	0,06	0,90
Muuramenjoki	0,07	0,00	0,71
Konneveden_Siikakoski_Kellokoski	0,07	0,00	0,76
Pielaveden_Koivujoki	0,14	0,00	1,00
Joutsan_Rutajoki	0,07	0,00	1,00
Saarijarvi_Peltojoki	0,22	0,00	0,77
Luutajoki	0,26	0,00	0,82
Isojoki	0,13	0,00	0,56
Rautalammi	0,06	0,00	0,52
Moksinjoki	0,50	0,02	0,90
Pirkanmaa	0,04	0,00	0,65
Kolkunjoki	0,21	0,00	0,66
Keskiarvjen keskiarvo	0,19		
Keskiarvojen minimi	0,04		
Keskiarvojen maksimi	0,50		