



Iijoen taimenten geneettinen analyysi

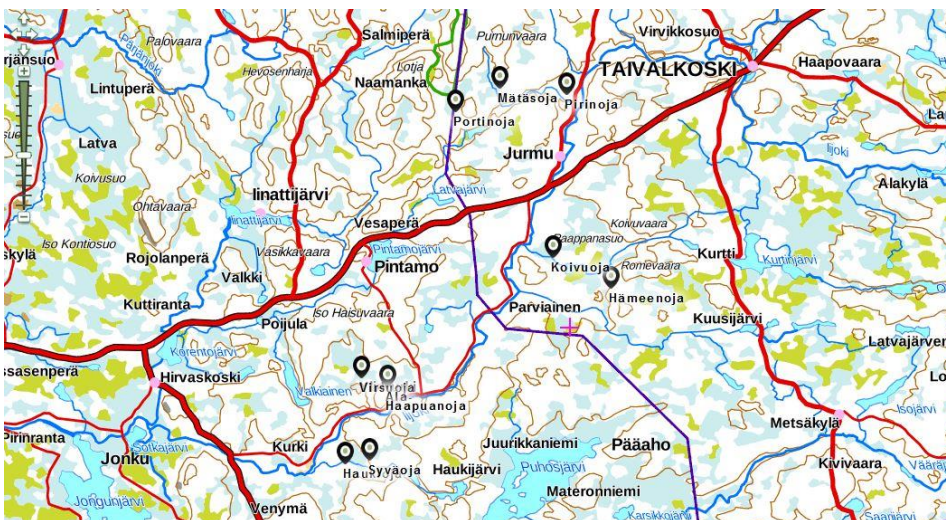
Tarkoituksena on kuvata Iijoen taimenten geneettistä rakennetta DNA-mikrosatelliittianalysien avulla. Pyrimme selvittämään esiintyykö tutkituilla alueilla toisistaan poikkeavia osapopulaatioita, vai onko geneettinen rakenne samankaltainen kaikkialla.

Aineisto ja menetelmät

Iijoesta kerättiin taimennäytteitä pääuomasta ja neljästä sivuhaarasta kesällä 2018, yhteensä 379 näytettä (taulukko 1 ja kuva 1). Näytteistä otettiin kudosnäyte DNA-analyysyä varten, ja lisäksi niistä mitattiin pituus ja paino. Lisäksi näytteitä saatiin Ohtaajan purotaimenter emokaloista, yhteensä 60 kpl.

Taulukko 1. Iijoen taimennäytteet

Kohde	Sivu-uoma	Päänumero näytteissä	Näytenumerot	Näytteitä (kpl)
Ala-Haapuaonoja – Virsuoja (1)		1	1.1- 1.104	104
Haukioja-Syväoja (2)	Haukioja	2	2.51-2.64	14
	Syväoja	2	2.1- 2.4	4
Pirinoja (3)	Pirinoja	3	3.1-3.40	40
	Mätäsoja	3	3.101 - 3.146	46
	Portinoja	3	3.201- 3.233, Portinoja 18 1-5	38
Koivuoja -Hämeenoja (4)	Hämeenoja	4	4.1-4.76	76
	Koivuoja	4	4.77-4.104	28
Pääuoma (6)		6	6.1-6.22, 6.52-6.58	29
Ohtaaja	Ohtaajan laitos, Ohtaajan kannan emokalat			60



Kuva 1. Iijoen taimennäytteiden näytteenottoaikat.

Laboratoriomenetelmät

Kudosnäytteet säilöttiin yksittäisiin etanolituubeihin ja säilytettiin +4 C lämpötilassa. Näytteistä eristettiin DNA menetelmällä, joka perustuu DNA:n sitoutumiseen silikajauheeseen ja kiinnittymiseen filtteriin mikrokuoppalevyllä (Elphinstone et al. 2003 ja Aljanabi et al. 1997). Näytteiden genotyypitys tehtiin 15 DNA-mikrosatelliittimarkkerin avulla: Ssosl438, Ssosl311, Str15inraP, LG-14_1, Str543inraP, Ssa197, LG-15_1, Strutta58, Str60inra, Str73inra, Ssosl417, Str85inraP, LG-10_2, Bs131 ja Ssa407, ja menetelmänä oli useissa tutkimuksissa käytetty protokolla pienin muutoksin (mm. Swatdipong et al 2010; Ozerov et al 2015).

Tilastomenetelmät

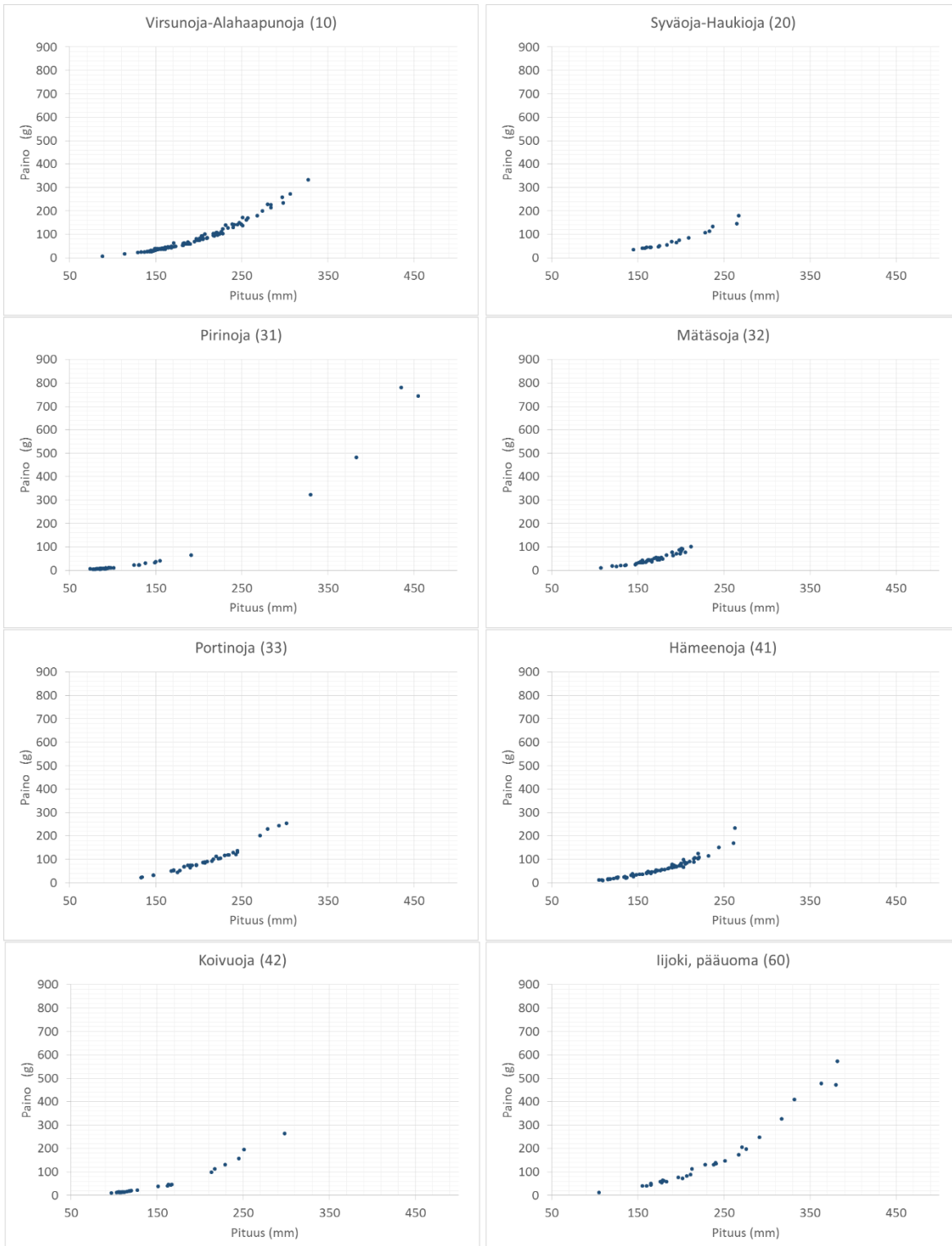
Perinnöllisen muuntelun määrää osapopulaatioissa kuvattiin heterotsygotian määrällä, geenidiversiteetillä, alleelien lukumäärällä, alleelirikkaudella, populaatioille uniikkien alleelien lukumäärällä ja osapopulaatioiden sisäsiittoisuuden asteella, jotka määritettiin Fstat 2.9.4-ohjelmalla (Goudet 1995). Aineistossa esiintyvien täyssisarperheiden määrä arvioitiin COLONY2-ohjelmalla (Jones & Wang 2010). Osapopulaatioiden välistä geneettistä eriytymistä kuvattiin Fst- ja Jost's D-arvoilla. Fst-arvo ja sen tilastollinen merkitsevyys Bonferroni-korjauksen jälkeen määritettiin Fstat-ohjelmalla. Jost's D-arvo määritettiin Genalex-ohjelmalla (Peakall & Smouse 2006). Hardy-Weinberg tasapaino tarkistettiin GenePop on the web-ohjelmalla (Raymond & Rousset 1995). Lisäksi tutkittiin kunkin näytteen geneettistä alkuperää ja sekoittumista STRUCTURE-ohjelman avulla käyttämällä admixture-mallia, joka sallii useamman alkuperän kullekin näytteelle (Pritchard et al 2000). Geneettisten ryhmien määrän (=K-arvon) annettiin vaihdella yhdestä kymmeneen. Ajo toistettiin viisi kertaa kullakin K:n arvolla. Kussakin ajossa käytettiin burn-in arvoa 100k, jonka jälkeen ajettiin 200k replikaattia. Eri K:n arvoilla ajettuja analyysejä verrattiin delta-K arvojen perusteella Structure Harvester-ohjelman avulla (Earl 2012).

Analyysejä varten Hauki- ja Syväojan näytteet yhdistettiin johtuen niiden vähäisestä määrästä. Analyyseissä näytteenottoaikoja kuvataan kaksinumeroisilla koodeilla (10, 20, 31, 32, 33, 41, 42, 60, 70), joista ensimmäinen numero viittaa pääalueeseen ja toinen numero sivualueeseen, jos sellainen on olemassa. Ohtaajan kannasta käytetään koodia 70. Käytetyt koodit käyvät ilmi mm. taulukosta 3.

Aineistosta poistettiin 8 pääuoman näytettä, jotka olivat mikrosatelliittiprofiilinsa perusteella hyvin todennäköisesti lohia. Neljällä taimennäytteellä genotyyppi-profiili oli identtinen toisen näytteen kanssa, näistä identtisistä pareista toinen poistettiin aina analyyseistä. Kolmen identtisen parin kohdalla kyse on todennäköisesti saman yksilön pyydystämisestä kahdella eri näytteenotokerralla. Yhden parin kohdalla kyseessä saattaa olla näytesekaannuksesta. Pienellä määrällä näytteitä DNA eristys ja/tai genotyypitys ei onnistunut, näille tehtiin uusinta-analyysi, jonka jälkeen suurimmasta osasta näytteitä saatiin riittävä genotyyppi-profiili. Taulukossa 3 ilmenee tilastoanalyyseissä käytettyjen yksilöiden lukumäärä.

Tulokset

Pituuden ja painon suhde tarkasteltiin paikkakohtaisesti. Tarkastelun perusteella kaikki näytteet kuuluvat luokkaan 1+ tai tätä vanhempiin.



Kuva 2. Pituuden ja painon suhde lijojen näytteissä.

Täyssisarusten muodostamien perheryhmien määrä

Koko aineistossa arvioitiin Colony-analyysin perusteella olevan 361 perhettä, joista suurimpaan osaan kuului vain yksi yksilö. Aineistosta ei poistettu samaan täyssisaruserveyden kuuluvia yksilöitä, koska suuria täyssisarusten parvia ei havaittu (taulukko 2).

Taulukko 2.

Täyssisarusten lkm	Perheryhmien lkm
1	315
2	39
3	3
4	3
5	0
6	1

Geneettinen monimuotoisuus

Geneettistä monimuotoisuutta kuvaavat muuttujat laskettiin kaikille näytteenottoaikoille erikseen (taulukko 3). Monimuotoisuuden muuttujat toimivat tässä yhteydessä lähinnä taustatietona ja dokumentaationa näiden paikkojen taimenkantojen tilasta kesällä 2018. Kaikkiaan havaittiin 140 alleelia eli geenimuotoa. Geenidiversiteetti ja alleelirikkaus ovat hieman korkeimpia pääuoman näytteissä kuin muissa paikoissa. Vain yhdelle populaatioille ominaisia privaattialleleja havaittiin hieman useammin Mätäsojassa, Portinojassa ja Koivuojoissa.

Taulukko 3. Tilastoanalyseissä käytettyjen näytteiden lukumäärä ja geneettistä monimuotoisuutta kuvaavat muuttujat osapopulaatioittain. Oletettu ja havaittu heterotsygotian aste (Exp/Obs Hz), geenidiversiteetti (Gen Div), kokonaisalleelirikkaus (Ar), keskimääräinen alleelirikkaus (Mean Ar), alleelien lukumäärä (Nr of alleles), privaattialleelien lkm (Priv allele), privaattialleelien frekvenssi (Priv allele freq), sisäsiittoisuuden aste (Fis).

Kohde	N	Exp /Obs Hz	Gen Div	Ar	Mean Ar	Nr of alleles	Nr of priv alleles	Priv allele freq	Fis per populati on
Ala-Haapuan-Virsuoja (10)	103	0,67/0,65	0,67	77,1	5,14	102	5	1-2%	0,037
Haukioja-Syväoja (20)	17	0,64/0,61	0,64	66,3	4,42	68	-	-	0,037
Pirinoja (31)	37	0,67/0,61	0,67	78,8	5,25	98	4	1-4%	0,081
Mätäsoja (32)	46	0,59/0,60	0,59	65,8	4,39	82	2	1-9%	-0,004
Portinoja (33)	35	0,61/0,60	0,61	68,3	4,55	77	3	1-9%	0,015
Hämeenoja (41)	75	0,60/0,61	0,60	64,1	4,27	75	1	1%	-0,01
Koivuoja (42)	28	0,66/0,65	0,66	76,2	5,08	88	3	2-9%	0,004
Pääuoma (60)	21	0,70/0,62	0,70	89,8	5,99	97	4	2-4%	0,108
Ohtaoja (70)	58	0,62/0,59	0,62	72,4	4,82	89	1	1%	0,039
Keskiarvo			0,64	73,2	4,9	86,2	2,9		0,034

Geneettinen rakenne ja alkuperä

Populaation geneettistä rakennetta kuvataan usein Fst-arvolla, joka perustuu alleeli- eli geenimuotojen eroihin (osa)populaatioiden välillä. Havaitut Fst-arvot osapopulaatioiden välillä eivät olleet kovin suuria, vaihdellen vähäisestä geneettisestä eriytymisestä (<0,05) kuvaavista arvoista kohtalaisen geneettisen eriytymiseen arvoihin (0,05-0,15). Geneettiset erot olivat siis melko pieniä, mutta kuitenkin tilastollisesti merkitseviä useimmissa parittaisissa vertailuissa (taulukko 4a). Portinojan ja muiden alueiden näytteiden välillä oli keskimääräistä suurempi ero Fst-arvoissa. Alleelien erilaisuutta osapopulaatioissa hieman toisella tavalla kuvaava Jost's D-arvo on esitetty taulukossa 4b.

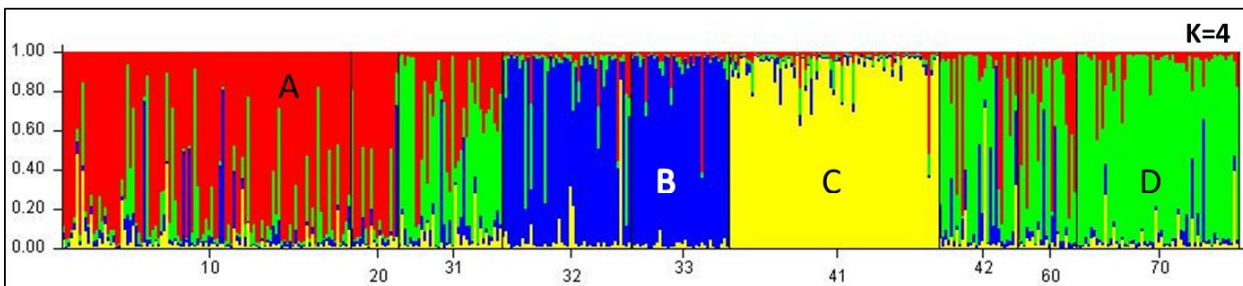
Taulukko 4a. Osapopulaatioiden väliset parittaiset Fst-arvot ja niiden tilastollinen merkitsevyys (oikeanpuoleinen yläkolmio).

	10	20	31	32	33	41	42	60	70
Virsunoja-Alahaapunoja	10		**	***	***	***	***	***	***
Syväoja-Haukioja	20	0,02		***	***	***	***	***	***
Pirinoja	31	0,02	0,04		***	***	***	NS	***
Mätäsoja	32	0,06	0,08	0,07		***	***	***	***
Portinoja	33	0,08	0,09	0,10	0,06		***	***	***
Hämeenoja	41	0,07	0,08	0,08	0,07	0,09		***	***
Koivuoja	42	0,03	0,04	0,02	0,05	0,07	0,07		NS
Iijoki pääuoma	60	0,02	0,04	0,01	0,07	0,09	0,08	0,02	
Ohtaoja	70	0,05	0,07	0,04	0,07	0,10	0,08	0,05	0,04

Taulukko 4b. Osapopulaatioiden väliset erot alleelifrekvensseissä (Jost's D) ja niiden tilastollinen merkitsevyys (oikeanpuoleinen yläkolmio).

	10	20	31	32	33	41	42	60	70
Virsunoja-Alahaapunoja	10		0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Syväoja-Haukioja	20	0,04		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Pirinoja	31	0,05	0,07		0,001	0,001	0,001	0,085	0,001
Mätäsoja	32	0,12	0,14	0,13		0,001	0,001	0,001	0,001
Portinoja	33	0,15	0,16	0,20	0,09		0,001	0,001	0,001
Hämeenoja	41	0,14	0,13	0,15	0,11	0,15		0,001	0,001
Koivuoja	42	0,05	0,08	0,04	0,08	0,13	0,12		0,011
Iijoki pääuoma	60	0,04	0,08	0,02	0,13	0,18	0,15	0,04	
Ohtaoja	70	0,09	0,13	0,08	0,12	0,17	0,13	0,08	0,08

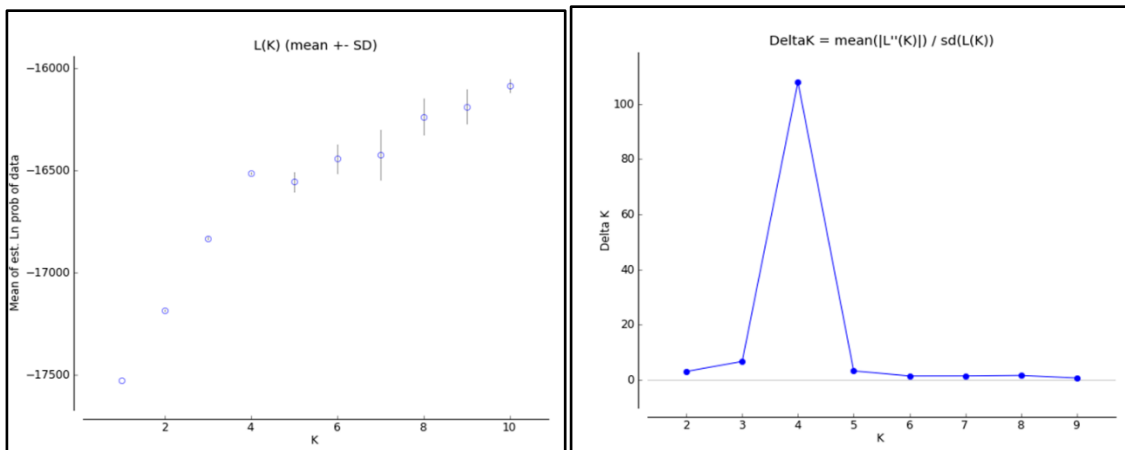
Structure-analyysin avulla voidaan tutkia yksilöiden alkuperää, ja määrittää kuinka monta ja minkälaisia geneettisiä ryhmiä aineistossa esiintyy. Tässä analyysi on tehty niin, että ohjelmistolla ei ollut tietoa mistä kukin näyte on kerätty, vaan analyysin tulokset perustuivat vain näytteiden sisältämään geneettiseen informaatioon. Structure-analyysin perusteella todennäköisin geneettisten ryhmien määrä (ns. K-arvo) oli neljä (kuva 4). Toisin sanoen tutkitut näytteet ryhmittäytyivät vähintään neljään geneettiseen ryhmään eli alkuperätyyppiin (kuva 3). Kuvassa 3 ilmenee, että analyysin perusteella selkeästi omaa alkuperätyyppiään edustivat Hämeenoja (ryhmä C, keltainen) ja Mätäsoja-Portinoja (ryhmä B, sininen). Ryhmään D (vihreä) kuului selkeästi Ohtaajan puurotaminen ja ryhmään A (punainen) suurin osa Virsunoja-Alahaapunojan ja Syväoja-Haukiojan näytteistä. Pirinojan ja pääuoman näytteissä nähdään sekä ryhmän A että D vaikutusta. Myös Koivuojan näytteissä on vaikutusta monesta alkuperästä. Näytteiden jakautuminen analyysissä havaittuihin neljään ryhmään ilmenee myös taulukossa 5.



Kuva 3. Näytteiden geneettinen alkuperä Structure-analyysin perusteella. Kuvassa on kaikki analysoidut yksilöt järjestettyinä näytteenottoaikaikittain (10-70). Yksilöitä kuvataan kapeilla vierekkäisillä pystypalkeilla, joiden värit edustavat erilaisia geneettisiä ryhmiä.

Taulukko 5. Näytteiden jakautuminen ("proportion of membership") neljään geneettiseen alkuperätyyppiin A-D ja niiden keskinäiset sekoittumissuhteet prosentteina.

		A	B	C	D
Virsunoja-Alahaapunoja	10	76	6	5	13
Syväoja-Haukioja	20	76	7	3	13
Pirinoja	31	30	8	6	56
Mätäsoja	32	5	79	6	10
Portinoja	33	5	90	2	3
Hämeenoja	41	3	3	91	3
Koivuoja	42	18	14	7	61
Iijoki pääuoma	60	33	9	3	55
Ohtaaja	70	6	5	4	85



Kuva 4. Eri K:n arvojen sopivuus aineistoon Structure-analyysin perusteella.

Tulosten tarkastelu

Paikkakohtaiset otoskoot vaihtelivat 17-103 välillä, mutta olivat lähellä yleisiä suosituksia (30-50 näytettä / paikka). Aineistossa ei havaittu suuria perheryhmiä, mikä osaltaan johtunee 0+ yksilöiden puuttumisesta. Näiltä osin aineistossa ei havaittu vakavia puutteita ja saatujen tulosten voidaan katsoa kuvaavan valittujen alueiden taimenkantoja. Vaikka tämän tutkimuksen tarkoituksena ei ollut suoranaisesti määrittää populaatioiden kokoa, voidaan geneettisen monimuotoisuuden muuttujien perusteella esittää alustava arvio, että kaikissa tutkituissa populaatioissa on todennäköisesti enemmän kuin vain muutama lisääntyvä yksilö.

Iijoen valuma-alue on suuri ja koostuu monista uomista ja sivuhaaroista. Näytteenotto tässä tutkimuksessa kohdistui vain pieneen osaan koko jokialuetta, lähinnä Hirvaskosken ja Taivalkosken väliselle osuudelle. Onkin mielenkiintoista, että jo tällä maantieteellisesti melko suppealla otannalla havaittiin geneettistä eriytymistä näytteenottoaikkojen välillä.

Fst-vertailujen ja Structure-analyysin tulokset olivat samansuuntaiset. Korkeimmat Fst-arvot saaneet osapopulaatiot erottuivat myös omina geneettisinä ryhminään Structure-analyysissä. Geneettisesti selkeimmin eriytynyt osapopulaatio näiden analyysien perusteella oli Hämeenoja. Lisäksi Mätäsoja ja Portinoja, jotka olivat keskenään hyvin samankaltaiset, erosivat selkeästi muista alueista. Kullekin populaatiolle ominaisten geenimuotojen (privaattialleelien) esiintyminen indikoi paikallisen geeniperimän säilymistä. Privaattialleelien lukumäärän lisäksi on tärkeää tarkastella niiden frekvenssiä (yleisyyttä), hyvin harvoin esiintyvät privaattialleelit eivät välttämättä ole informatiivisia. Mätäsojan, Portinojan ja Koivuojan osapopulaatioissa havaittiin privaattialleeleja, joiden frekvenssi vaihteli 2-9% välillä. Näiden osapopulaatioiden geneettisessä materiaalissa voidaan olettaa säilyneen paikallisia piirteitä, joita Iijokeen tehtyjen istutusten mahdollinen vaikutus ei ole peittänyt. Yleisenä huomiona voidaan mainita, että nämä osapopulaatiot sijaitsivat usein kauempana päähaarasta, ja mahdollisesti edustamiensa sivuhaarojen latva-alueilla.

Tämän aineiston perusteella näyttää siltä, että Iijossa esiintyy mahdollisesti useita geneettisesti eriytyneitä taimenpopulaatioita. Tässä tutkimuksessa sellaisia havaittiin ainakin kolmella alueella, Hämeenojassa,

Ohtaajassa ja Mätäsoja-Portinojassa. Myös Virsunoja-Alahaapunoja ja Syväoja-Haukioja muodostivat geneettisesti melko omanlaisen ryhmänsä. Ottaen huomioon lijoen laajuuden ja sivuhaarojen määrän, on hyvinkin mahdollista, että eriytyneitä populaatioita on enemmänkin.

Tuntematta lijoen taimenkannoissa esiintyvää kokonaisvaihtelua ja ilman vertailua muiden jokien kantoihin, ei voida varmuudella sanoa missä määrin nyt havaitut geneettiset erot heijastelevat lijoelle ominaisen alkuperäiskannan olemassaoloa. Geneettisen eriytymisen ja privaattialleelien esiintymisen perusteella voidaan alustavasti spekuloida Mätäsojan ja Portinojan muodostaman geneettisen ryhmän omaavan geneettisiä piirteitä, jotka voisivat olla ominaisia tälle alueelle.

Toimintasuosituksia tulosten perusteella

Tämän tutkimuksen perusteella näyttää siltä, että lijoessa esiintyy mahdollisesti useita geneettisesti eriytyneitä taimenpopulaatioita. Suosittelemme geneettisiä jatkotutkimuksia ja erityisesti otannan laajentamista, jotta saadaan muodostettua kokonaiskuva lijoen taimenten geneettisestä vaihtelusta. Lisäksi vertailuun olisi hyvä saada mukaan näytteitä muista taimenjoista, jolloin voitaisiin selvittää lijoen taimenten geneettistä monimuotoisuutta ja eriytymistä suhteessa muiden jokien kantoihin.

Geneettisesti eriytyneet populaatiot sijoittuivat usein kauemmaksi pääuomasta ja usein sivuhaarojen latvoille. Olennaista olisi varmistaa näiden kantojen (ja niiden geneettisten ominaispiirteiden) säilyminen parantamalla kantojen omia lisääntymisedellytyksiä erilaisilla elinympäristön kunnostustoimenpiteillä, tai tapauskohtaisesti muin sopivin keinoin.

Mikäli istutuksia tehdään, tulisi välttää niiden kohdistamisesta näille mahdollisten alkuperäiskantojen kannalta potentiaalisille alueille. Sivuhaarojen osapopulaatioiden, ja niissä esiintyvän geneettisen monimuotoisuuden, suojelemiseksi emme siis suosittele istutuksia, jotka toisivat kantaan todennäköisesti alkuperäisestä poikkeavia geenimuotoja.

Tulosten perusteella näyttää siltä, että jo tässä nyt tutkitussa, maantieteellisesti melko suppeassa osassa lijokea esiintyy geneettisesti toisistaan eriytyneitä populaatioita. Tämä havainto ei tue näkemystä, että lijoelle olisi syytä perustaa oma uusi istutuskanta korvaamaan aiemmin käytettyä Rautalammin kantaa. Tällaisen ”lijokisen kannan” käyttäminen laajoihin istutuksiin heikentäisi nyt havaitun geneettisen rakenteen ja geneettisten ominaispiirteiden säilymistä, samaan tapaan kuin aiemmat istutukset Rautalammin kannasta.

Viitteet:

- Aljanabi, SM & Martinez, I 1997. Universal and rapid salt-extraction of high-quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucl. Acids Res.* 25:4692–4693.
- Earl, DA & vonHoldt, BM 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4(2):359–361
- Elphinstone, MS, Hinten, GN, Anderson, MJ & Nock CJ 2003. An inexpensive and high-throughput procedure to extract and purify total genomic DNA for population studies. *Mol. Ecol. Notes* 3:317–320.
- Goudet, JF 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of heredity* 86(6):485–6.
- Jones OR & Wang J. 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular ecology resources* 10(3):551–5.
- Ozerov M, Jürgenstein T, Aykanat T, Vasemägi A 2015. Use of sibling relationship reconstruction to complement traditional monitoring in fisheries management and conservation of brown trout. *Conservation biology* 29(4):1164–75.
- Peakall RO & Smouse PE 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes* 6(1):288–95.
- Pritchard JK, Stephens M & Donnelly P 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2):945–59.
- Raymond M & Rousset F 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86:248–249.
- Swatdipong et al 2010 "High level of population genetic structuring in lake-run brown trout, *Salmo trutta*, of the Inari Basin, northern Finland". *Journal of Fish Biology* 77(9):2048–2071.