

eDNA-menetelmän soveltuvuus fladoissa ja kluuveissa kutevan ahvenkannan ja poikastuotannon määrien arviointiin

Hanna-Leea Lampinen

Pro gradu -tutkielma

Turun yliopisto
Biologian laitos
Kesäkuu 2023

Ohjaajat:

FT Terhi Iso-Touru
FT Eero Vesterinen

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck-järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO, biologian laitos
Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

LAMPINEN, HANNA-LEEA: eDNA-menetelmän soveltuvuus fladoissa ja kluuveissa kutevan ahvenkannan ja poikastuotannon määrien arviointiin

Pro gradu -tutkielma, 38 s.
Kesäkuu 2023

Ahvenen tärkeimpiä lisääntymisalueita ulkosaaristossa ovat fladat, kluuvit ja kluuvijärvet, niiden suotuisten olosuhteiden vuoksi. Nämä luonnonmukaiset alueet ovat kuitenkin muuttuneet esimerkiksi ruoppauksen ja rehevöitymisen vuoksi, heikentäen lisääntymisaluiden poikastuottavuutta. Tällaisille lisääntymisalueille suunnitellaan ja tehdään kunnostuksia ekologisten toimintojen palauttamiseksi. Kunnostusten tuloksia ei ole aikaisemmin juurikaan seurattu. Perinteisesti käytössä olleet seurantamenetelmät mätinauhojen laskenta sukelluksen ja droonin avulla, otos-pyynti rysällä kutukannan kokoajakauman ja suuruuden selvittämiseksi, kameraseuranta nousevien ja ulosvaeltavien kalojen laskennassa, sekä vastakuoriutuneiden poikasten tiheyden arviointi ovat osin haasteellisia ja niitä rajoittavat myös olosuhteet. Ympäristö-DNA eli eDNA (engl. *environmental DNA*), luo mahdollisuuden seurata lisääntymisaluiden kunnostusten tuloksellisuutta yksinkertaisemmin ja edullisemmin.

Tämän pro gradu -työn pääasiallisena tarkoituksena oli selvittää, soveltuuko eDNA-menetelmä ahvenkannan ja poikastuotannon määrien arviointiin. Viidestä eri pienvesistökohteesta kerätyistä eDNA-näytteistä eristettiin DNA, jota analysoitiin tarkkoja PCR-menetelmiä hyödyntäen. Työn aikana optimoitiin ensin PCR-menetelmä, jota siten sovellettiin uudessa digitaali-PCR:ssä varsinaisilla näytteillä. PCR:llä tuotettuja tuloksia verrattiin perinteisillä mittausmenetelmillä saatuihin tuloksiin.

Tulokset osoittavat, että eDNA-menetelmän avulla pystytään seuraamaan lajin esiintymistä pienvesistökohteissa sekä seuraamaan vaihtelevuutta DNA-pitoisuuksissa eri ajankohtina ja laskemaan niistä ahventen biomassaa. Tuloksista pystyi myös toteamaan, että menetelmään vaaditaan kehitystä ja tarkempia tietoja vertailuaineiston osalta, jotta tuloksista pystyttäisiin luotettavammin arvioimaan pitoisuuksien korrelointia ahventen biomassaan aikuisten ahventen, poikasten ja mädin osalta.

ASIASANAT: eDNA, dPCR, ahven, polymeerasiketjureaktio

Sisälllys

1. Johdanto.....	1
1.1 Ahvenen lisääntymisalueet.....	1
1.2 Lisääntymisalueiden heikentyminen	2
1.3 Lisääntymisalueiden kunnostukset	3
1.4 Kunnostusten seuranta.....	4
1.4.1 Pienvesistökohteet.....	4
1.6 Ympäristö-DNA (eDNA).....	6
1.7 eDNA-analyseissa käytettävät PCR-menetelmät	8
1.7.1 Qiagenin digitaal-PCR (dPCR) laitteisto QiaCuity.....	9
2. Aineisto ja menetelmät	11
2.1 Vesistönäytteet.....	11
2.2 DNA-eristys	12
2.3 Menetelmän optimointi – gradientti-PCR	14
2.4 Menetelmän optimointi - qPCR.....	16
2.5 eDNA-näytteiden analyysiajo - dPCR	16
2.6 Vertailuaineisto.....	17
2.7 Analysointi.....	17
3. Tulokset.....	19
3.1 Optimointitulokset.....	19
3.3 eDNA tulokset	20
3.3.1 Solbackfladan	20
3.3.2 Sommaröträsket.....	21
3.3.3 Ytteröfladan	22
3.3.4 Roliggropen	22
3.3.5 Backfladan	23
3.4 Vertailuaineiston tulokset.....	24
3.5 Tulosten yhteenveto	26

4. Pohdinta	28
4.1 Ympäristö-DNA-pitoisuuksien ajankohdat.....	28
4.2 Vesistöjen ominaisuuksien vaikutukset tuloksiin	28
4.3 Näytesuodatukset, DNA-eristys ja PCR-analyysiajo	29
4.3 Jatkotutkimusmahdollisuudet.....	29
4.4 Tutkimustulosten merkitys	30
KIITOKSET	31
Lähteet.....	32
Liitteet	38

1. Johdanto

1.1 Ahvenen lisääntymisalueet

Tuottavat ja vakaat kalakannat ovat elinehto kaupalliselle ja vapaa-ajan kalastukselle, sekä ympäristön monimuotoisuudelle. Ahven (*Perca fluviatilis L.*) on yksi Suomen merialueen merkittävistä kaupallisen kalastuksen saalislajeista (Kuningas ym. 2019). Ahvenen lisääntymisalueilta vaaditaan tietynlaisia olosuhteita, jotta lisääntyminen onnistuu ja poikaset pysyvät elossa. Vaellusyhteyden lisääntymisalueille tulee olla virtausnopeudeltaan ja esteiltään ahvenelle sopiva. Lisäksi vettä tulee olla riittävä määrä ja matkalla tulee olla levähdyspaikkoja. Ahven vaatii kutuaikaan veden lämpötilan ylittävän +7°C astetta. Veden lämpötila vaikuttaa mädin kehittymiseen sekä poikasten kasvuun ja kuolleisuuteen. Ahvenen lisääntyminen vaatii vedenlaadulta yli viiden pH-arvoa ja riittävän alhaista suolapitoisuutta. Vesi ei myöskään saa olla liian sameaa, koska näköaistin avulla tapahtuva saalistus vaikeutuu. Ahven vaatii kutualueellaan riittävästi kutualustoja. Tällaisia ovat esimerkiksi järviruoko ja kaatuneet puun rungot. Kasvillisuutta tulee olla riittävästi, jotta poikaset pystyvät suojautumaan ja hankkimaan ravintoa (Hynninen 2019; Urho ym. 1990).

Fladat, kluuvit ja kluuvijärvet ovat tärkeimpiä ulkosaariston lisääntymisalueita ahvenelle ja monelle muulle kevätkutuiselle kalalajille. Aikaisempien fladoissa tehtyjen poikasten tiheysmittausten mukaan poikasmäärät saattavat olla huomattavasti runsaampia verrattaessa hyvin poikasia tuottaviin jokisuistoihin (Kuningas ym. 2019).

Näiden paikkojen suotuisuus lisääntymiselle johtuu etenkin veden lämpötilasta, joka nousee keväisin nopeammin kuin ympärillä olevan merialueen. Fladoissa, kluuveissa ja kluuvijärvissä veden korkeus on matalampi ja virtaus heikompi kuin merialueella. Lisäksi alueet sisältävät runsaasti kasvillisuutta ja eläinplanktonia, joten ympäristö on poikasille suotuisa paikka kasvaa suojan ja ravinnon vuoksi (Hynninen ym. 2019; Scheinin ja Mattila 2010; Snickars ym. 2010; Sandström ym. 1997).

Näistä kolmesta pienvesialueesta fladalla on suurin yhteys mereen. Flada on kuroutunut merenlahdista maaperän kohoamisen myötä. Sen ja merialueen välissä on matalavesinen kynnyksen tai kaksi, jonka vuoksi vesi vaihtuu heikosti, eikä virtaus ole voimakasta.

Fladasta muodostuu ajan kuluessa kluuvi, jolloin vesiyhteyden suuaukossa kasvillisuus lisääntyy ja lopulta kuroutuu umpeen. Merivesi pääsee kluuviin satunnaisesti meriveden ollessa korkealla. Fladan muuttuminen kluuviksi on seurausta maan jatkuvasta kohoamisesta, jolloin keskivedenpinta on meressä alempana kuin välissä oleva törmä. Kluuvista saattaa kuitenkin johtaa noro mereen. Kluuvijärvi on kluuvia vahvemmin eristäytynyt merestä, merivesiyhteys muodostuu vain poikkeuksellisissa olosuhteissa (Hynninen ym. 2019; Metsähallitus 2020).

1.2 Lisääntymisalueiden heikentyminen

Ahvenen on havaittu vähentyneen Suomenlahden ja Saaristomeren ulkosaaristoalueilla (Ljunggren ym. 2010). Syyksi epäillään lisääntymisalueiden heikentymistä. Näiden alueiden heikentyminen vaikuttaa johtuvan ihmistoiminnasta. Luonnonmukaiset alueet ovat muuttuneet ruoppauksen, perkauksen, rehevöitymisen ja happamoitumisen vuoksi (Hynninen ym. 2019).

Veden happamoituminen on fladojen, kluuvien ja kluuvijärvien kohdalla yleinen uhka rannikkoalueilla. Tämä johtuu sulfaattimaiden happamoitumisesta, joissa ojitus aiheuttaa maaperän rikin hapettumista ja sitoutuneen veden happamoitumista. Näiden valuma kulkeutuu vesistöihin alentaen pH-arvoa. Mikäli pH-arvo laskee alle kuuteen, alkaa alumiini saostua kalojen kiduksissa (Lappalainen ym 2021; Hynninen ym 2019).

Fladan rehevät olosuhteet muodostuvat osaltaan vähentyneellä veden vaihtuvuudella merialueen kanssa. Kulkuväylien ruoppauksen vuoksi veden vaihtuvuus lisääntyy huomattavasti, mikä laskee myös veden lämpötilaa. Usein ruoppausten syynä on se, että fladaan säilyisi veneyhteys. (Wikström 2004; Wistbacka 2014).

Fladojen liiallisen rehevät olosuhteet aiheutuvat maatalouden ja metsätalouden päästöistä sekä muista jätevesistä. Näiden päästöjen kautta vesistöön valuvat ravintoaineet aiheuttavat kasvien perustuotannon kasvua. Rehevöitynyt kasvu lisää pohjan lähellä olevan veden hapettomuutta, sameaa vettä ja leväkukintoja. Rehevöitymisestä kärsivät etenkin Suomenlahti ja Saaristomeri (SYKE 2019).

Kalastus vaikuttaa osaltaan ahvenkantaan ja säätelytarvetta lisääntymisaikaan pidetään tarpeellisena. Rannikkoalueiden vähäisten lisääntymisalueiden vuoksi olisi nämä alueet

kutuaikaan hyvä saada pidettyä kalastuksen ulkopuolella, jotta kalat ehtisivät lisääntyä (Lappalainen ym 2021; Hynninen ym 2019).

1.3 Lisääntymisalueiden kunnostukset

Uusia menetelmiä rannikon kalojen lisääntymisalueiden kunnostuksiin suunnitellaan ja toteutetaan (Veneranta 2021). Vesistöjen entisöinnillä ja kunnostuksilla pystytään palauttamaan vesistöjä tilaan, jossa ekologiset toiminnot palaavat. Toimenpiteissä tulisi huomioida vesistöalueen alkuperäinen luokitus, jotta toimenpide tuottaa halutun kaltaisen lopputuloksen ja palauttaa alueen monimuotoisuuden. (Wikström 2004; Wistbacka 2014).

Kunnostuksia tehdään esimerkiksi entisöinnillä, jossa pyritään palauttamaan vesistö alkuperäiseen tilaan. Toimenpiteen tarkoituksena on saada vesistöissä ekologiset toiminnot palaamaan. Ruoppauksesta aiheutunut luontaisen fladan tai kluuvien kehittymisen estyminen saadaan entisöityä ruopatun kanavan täyttämällä. Kunnostuksissa tulee ottaa huomioon vesilaki (luku 2, § 11), jonka tarkoitus on suojata näitä alueita (Wistbacka 2014).

Merenkurkulla sijaitseva Backfladan on yksi kunnostuskohde, jossa laskupuro oli rehevöitymisen vuoksi kasvamassa umpeen ja esti näin nousevien kalojen kulun (Kuva 1). Elokuussa 2019 laskupuron uomasta poistettiin ruovikkoa ja lisättiin kiviä. Tammisaaren edustalla Solbackfladan kulkuväylä oli myös kasvanut umpeen ja vaati huomattavan merialueen nousun, jotta yhteys olisi toimiva. Uomaan tehtiin niittotyö huhtikuussa 2020. Ytteröfladan sijaitsee samalla alueella, sen suuaukkoa oli levennetty niin, että veteen saa uitettua sisälle. Suuaukkoa pienennettiin kivettämällä huhtikuussa 2020 (Kuningas ym 2021).



Kuva 1. Merenkurkulla sijaitseva Backfladan ennen kunnostustöitä. Etualan kasvuston täyttämästä uomasta poistettiin ruovikkoa ja lisättiin kiviä (Kuva Lari Veneranta).

1.4 Kunnostusten seuranta

Fladojen ja kluuvien kunnostusten tuloksista ei ole ollut aikaisemmin juurikaan seuranta. Vuonna 2017 aloitetussa Kalatalouden ympäristöohjelma hankkeessa Sininen Luomu - Rannikon kutu- ja poikasalueiden kunnostus, seuranta toteutetaan eri menetelmin. Käytössä olevia seurantamenetelmiä ovat esimerkiksi: 1) mätinauhojen laskenta sukelluksen ja droonin avulla, 2) otos-pyynti rysällä kutukannan kokojakauman ja suuruuden selvittämiseksi, 3) kameraseuranta nousevien ja ulosvaeltavien kalojen laskennassa sekä 4) vastakuoriutuneiden poikasten tiheyden arviointi. Perinteisissä menetelmissä on haasteita, kuten lukumäärien laskennan työläys ja droonin käytössä olosuhderajoitukset. Ympäristö-DNA:n eli eDNA:n (environmental DNA) avulla on mahdollista edullisemmin ja yksinkertaisemmin seurata kalojen lisääntymisalueiden kunnostusten tuloksellisuutta (Veneranta 2021; Kelly ym. 2014).

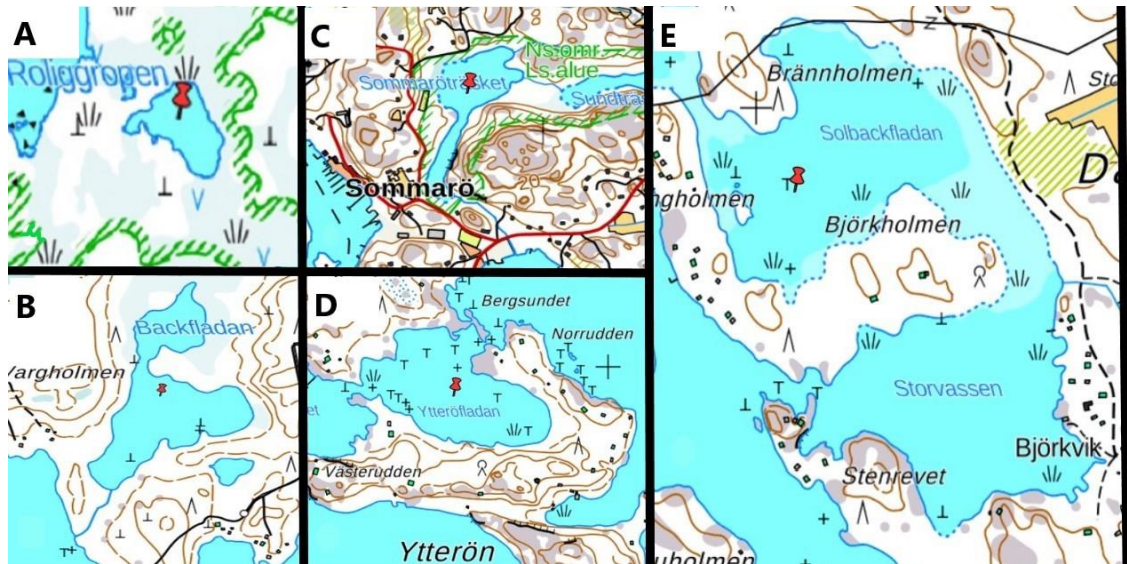
1.4.1 Pienvesistökohteet

Sininen Luomu hankkeessa ahvenen seuranta on tehty useammassa pienvesistökohteessa, tarkoituksena selvittää kunnostustöiden tuloksellisuutta ja seurata kalakantoja. Näistä kohteista viidestä on kerätty tietoa perinteisin menetelmin sekä otettu eDNA-näytetuodatuksia. Kaksi kohteista sijaitsee Merenkurkun alueella Vaasan edustalla ja kolme Suomenlahdella Tammisaaren edustalla (Kuva 2) (Veneranta ym. 2021).



Kuva 2. Karttakuva, jossa punaisella merkattu pienvesistökohteet, joissa seurattu ahvenen kalakantaa ja kunnostustöiden tuloksellisuutta perinteisin menetelmin, sekä eDNA-näytesuodatuksilla (Kuva muokattu Maanmittauslaitos 2022).

Merenkurkun alueella Roliggropen on vesistötyypiltään kluuvi ja Backfladan on flada. Suomenlahden alueella Ytteröfladan on flada, ja Sommaröträsket, sekä Solbackfladan kluuveja (Kuva 3). Kaikissa kohteissa on tehty kunnostustöitä alueen ennallistamiseksi.



Kuva 3. Pienvesistökohteet, joissa tehty ahvenen seuranta ja eDNA-näytesuodatuksia. Merenkurkun alueella Roliggroppen (A) ja Backfladan (B). Suomenlahdella Sommaröträsket (C), Ytteröfladan (D) ja Solbackfladan (E) (Kuva muokattu Maanmittauslaitos 2022).

1.6 Ympäristö-DNA (eDNA)

Ekologiset tutkimukset hyötyvät uusien geneettisten menetelmien kehityksestä. eDNA on yksi menetelmistä, jonka avulla voidaan helpottaa tutkimusten tekemistä (Barnes & Turner, 2016). Kaikki olennot sisältävät DNA:ta ja tuottavat eloperäistä materiaalia ympäristöönsä, kuten kuolleita soluja ja metabolisen aineenvaihdunnan tuotteita. Nämä materiaalit säilyvät ympäristössä jonkin aikaa. Tämän vuoksi ympäristöstä kerätyt näytteet tarjoavat mahdollisuuden tutkia siellä esiintyviä lajeja eDNA:n avulla (Kelly ym. 2014; Pawlowski ym. 2020).

eDNA on geneettistä materiaalia, jota voidaan eristää esimerkiksi vedestä tai maaperästä kerätyistä näytteistä. eDNA-menetelmää käytetään yhä enemmän mitä erilaisimpiin sovelluksiin. Menetelmä on hyödyllinen etenkin tilanteissa, joissa kokonaisen organismin kerääminen on epäkäytännöllistä, epäeettistä tai mahdotonta. Potentiaalisimpana eDNA:n käyttö nähdään esimerkiksi populaation tunnistamisessa ja sen koon arvioinnissa (Barnes ja Turner 2016; Schenekar 2023).

Tietyn lajin tunnistaminen eDNA:n avulla on lisääntynyt viimeisen kymmenen vuoden aikana. Vesistöissä oletuksena on, että siellä elävän lajin DNA on läsnä suhteellisen tasaisesti levittäytyneenä, vaikkakin pilkkoutuneena. DNA:n ei oleteta säilyvän pitkiä aikoja, koska ympäristön ominaisuudet, kuten UV-säteily, hajottavat sitä (Rees ym., 2014).

Ensimmäinen tutkimus makean veden yhden lajin tunnistuksesta eDNA:n avulla tehtiin onnistuneesti vuonna 2008. Tutkimuksessa oli mukana kontrolloitu ja luonnollinen ympäristö, joista löydettiin tutkittavan sammakolajin DNA:ta. Tutkimuksessa käytettiin lajispesifejä alukkeita mitokondriolisesta DNA sekvenssistä (Ficetola ym., 2008). Meriveden ensimmäiset onnistuneet eDNA-tutkimukset tehtiin Tanskassa vuonna 2012. Ensimmäisessä tutkimuksessa tarkkailtiin pyöriäisen esiintymistä Tanskan rannikolla (Foote ym., 2012). Toisessa tutkimuksessa eDNA-menetelmää hyödynnettiin kalalajien monimuotoisuuden arvioinnissa (Thomsen ym., 2012).

Myöhemmin useat tutkimukset ovat hyödyntäneet eDNA:ta yhden lajin tunnistuksessa, eri vesistötyypeissä, usealla eri lajilla. eDNA:ta on hyödynnetty onnistuneesti esimerkiksi invasiivisen lajin havainnoinnissa perinteisten menetelmien rinnalla (Dejean ym., 2012; Hunter ym., 2015). Lisäksi on osoitettu, että eDNA:ta pystytään hyödyntämään kalalajien tutkimuksissa, sekä useamman että, yhden lajin tunnistuksessa (Dejean ym., 2011; Jerde ym., 2011, 2013; Mahon ym., 2013; Minamoto ym., 2012; Wilcox ym., 2013).

eDNA-näytteet vaativat tarkan näytteiden keräysprotokollan, DNA-eristyksen ja PCR-olosuhteet, joilla mahdollistetaan luotettavat tulokset. Useissa tutkimuksissa näytesuodatuksia on tehty saman vesistön eri osista, jotta mahdollisuus lajin löytymiselle eDNA:n avulla kasvaisi (Dejean ym., 2012; Goldberg ym., 2013; Strand ym., 2019; Takahara ym., 2012). Eri osista vesistöä kerättyjen näytteiden yhdistäminen kokoomanäytteeksi ja siitä tehtyjen rinnakkaisten suodatusten on osoitettu lisäävän tulosten luotettavuutta (Piaggio ym., 2014; Pilliod ym., 2013). Vesistöistä kerätyistä eDNA-näytteistä on havaittu PCR-reaktiota inhihoivia tekijöitä, etenkin jos suodatetut näytetilavuudet ovat olleet suuria. Tällainen voi luonnon vesistöissä olla esimerkiksi maaperästä nouseva humus, joka aiheuttaa vääriä negatiivisia tuloksia (Gasparini ym., 2020; Lance & Guan, 2020).

Vesistönäytteiden keruu- ja suodatusmenetelmät ovat aikaisemmissa tutkimuksissa vaihdelleet. Suodatettujen näytteiden tilavuudet vaihtelevat 500ml ja 10l välillä, ja suodatusfilttereiden tiheydet vaihtelevat 0,45 μ m ja 5 μ m välillä. Näihin tekijöihin vaikuttaa vesistön tyyppi. Pienimpiä näytesuodatustilavuuksia hyödynnetään kontrolloiduissa ympäristöissä, kuten vesitankeissa, suurimpia tilavuuksia luonnonvesissä, kuten järvissä ja puroissa. Vesistönäytteiden keruualueeseen vaikuttaa vesistön ja havainnoitavan lajin

tyyppi. Esimerkiksi vesistön pohjassa elävän ravun DNA:ta oletetaan löytyvän suuremmalla todennäköisyydellä pintavettä syvemmältä (Rees ym., 2014).

1.7 eDNA-analyseissä käytettävät PCR-menetelmät

Erilaisten PCR-menetelmien käyttö eDNA-näytteiden analysoinnissa on monipuolista. Menetelmät on valittu tutkimuksen aihepiiriin ja tutkittavien näytteiden perusteella (Coble ym., 2019). Lajiyhteisöjen tunnistuksessa hyödynnetään useimmiten massaviivakoodausta (engl. *metabarcoding*), jossa monistetaan yksi tai useampi informatiivinen alue yleensä mitokondriaalista DNA:ta taksonomisesta kohderyhmästä. Tämän jälkeen monistetut fragmentit sekvensoidaan ja tunnistetaan vertaamalla referenssitietokantaan (Miya 2022; Valentini ym. 2016). eDNA-näytteiden analysoinnissa on hyödynnetty myös ilman PCR:ää tehtävää suoraa massasekvensointia eli metagenomiikkaa (engl. *metagenomics* tai *shotgun sequencing*). Menetelmiä on hyödynnetty muun muassa mikrobiyhteisöjen tutkimuksessa (Fuks ym., 2018; Miya 2022). Metagenomi-analyysissä sekvensoidaan sattumanvaraisesti kaikista genomeista DNA-fragmentteja, jolloin tuloksena on teoriassa parempi vastaavuus sekvenssien määrän ja alkuperäisen näytteen eri lajien biomassan välillä. Metagenomiikkaa on hyödynnetty muun muassa lajiyhteisön tunnistuksessa (Cowart ym. 2018; Miya 2022) ja ulostetutkimuksessa (Veikkolainen ym. 2014). Menetelmän haasteina ovat eDNA:n vähäinen määrä sekä fragmentoituminen.

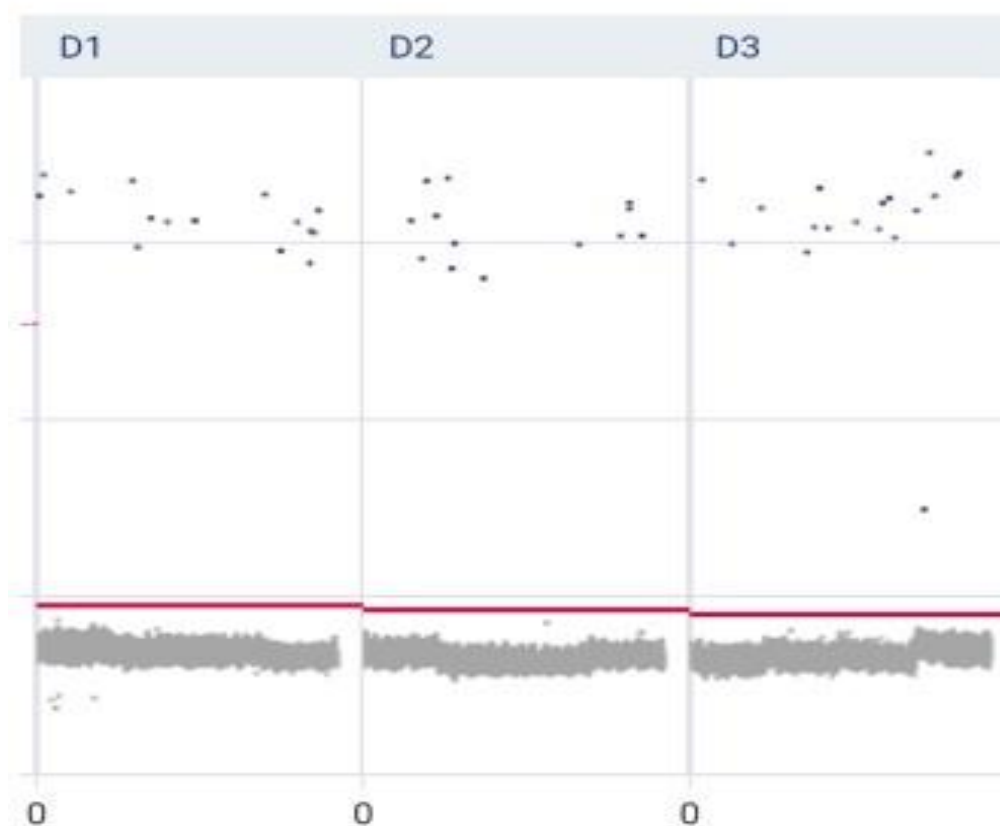
Yhden lajin tunnistuksessa on käytetty kvantitatiivista PCR-menetelmää (engl. *quantitative real-time PCR*, *qPCR*), sekä digitaalista PCR-menetelmää (engl. *digital PCR*, *dPCR*; *digital droplet PCR*, *ddPCR*). Kaikissa näissä menetelmissä monistetaan tietyn kohdelajin DNA:ta ja mitataan sen pitoisuutta. dPCR-menetelmän on osoitettu olevan tarkempi kuin qPCR-menetelmän tunnistamaan etenkin pieniä pitoisuuksia eDNA:ta. Lisäksi dPCR ei ole yhtä herkkä PCR-reaktiota inhiboiville tekijöille (Doi ym., 2015; Wood ym., 2019).

Yhden lajin tunnistuksessa täytyy huomioida kohdelajin lajispesifit alukkeet, jotta tulokset ovat luotettavia. Kirjallisuudesta löytyy useista eläimistä, kuten monista kalalajeista, jo käytössä olevia tunnettuja lajispesifejä alukkeita. Tällaiset testatut alukkeet monistavat tietyn lajin perimää, mutta eivät mitään muuta lajia. Mitokondriossa sijaitseva COI-geeni (engl. *cytochrome c oxidase subunit I*) on yleisesti käytössä oleva geeni eläimillä tehtävissä tutkimuksissa. (Deagle ym., 2014) Aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että menetelmän optimoinnilla ja tarkasti tietyille lajille suunnitelluilla alukkeilla eDNA-

menetelmää voidaan hyödyntää luotettavasti (Ficetola ym., 2008; Strand ym., 2019; Wood ym., 2019)

1.7.1 Qiagenin digitaali-PCR (dPCR) laitteisto QiaCuity

Laitteisto sisältää viisi detektiokanavaa ja 24-kaivoisen pipetointilevyn, jossa on 26000 PCR-reaktiokaivoa. Jokainen kaivo pystyy sitomaan itseensä 1–5 kohdemolekyyliä. Laitteisto laskee positiivisten reaktioiden määrän ja antaa tulokset kopioina mikrolitrassa, sekä sirontakaavioina kaivoista (Kuva 4) (Qiagen 2021; Whale ym. 2016).



Kuva 4. Esimerkkikuva partitiojakauman sirontakaaviosta dPCR-pipetointilevyltä analyysilaitteistolla.

dPCR-menetelmän periaate perustuu absoluuttiseen kvantifointiin, jossa hyödynnetään Poissonin jakauman kaavaa. Jokaisessa reaktiokaivossa tapahtuu yksittäinen PCR-reaktio ja sen sisältäessä monistetun kohdesekvenssin, fluoresenssivalo havaitsee reaktion. Tulos suhteutetaan negatiivisiin reaktioihin, jolloin näytteestä saadaan laskettua konsentraatio. (Quan ym. 2018).

Tässä työssä on tarkoitus tutkia fladoista ja kluuveista kerättyä eDNA:ta, josta tunnistetaan ahvenen DNA:n määrät dPCR-menetelmällä. Ahvenen DNA-määriä verrataan perinteisin menetelmin tuotettuun runsausdataan. Näin voidaan pohtia, millainen potentiaali uusilla DNA-menetelmillä on tulevaisuuden kalakantojen tarkkailussa.

2. Aineisto ja menetelmät

2.1 Vesistönäytteet

Tutkimuksessa käytettiin aineistona fladoista ja kluuveista kerättyjä vesistönäytteitä. Vesistönäytteet kerättiin osana laajempaa Luonnonvarakeskuksen koordinoimaa tutkimusprojektia ”Rannikon kutu- ja poikasalueiden kunnostus”. Näytteet kerättiin maaliskokuun välisenä aikana, viitenä eri ajankohtana, viideltä eri pienvesialueelta vuonna 2021 (Taulukko 1).

Taulukko 1. Pienvesialueiden kohdetiedot, sijaintikoordinaatit ja volyymit.

Kohde	Sijainti (WSG84)	Alue (ha)	Alue (m ²)	Keskisyvyys (m)	Tilavuus (m ³)
Solbackfladan	59.9003°N 23.3534°E	14,5	145000	0,96	139200
Sommaröträsket	59.9047°N 23.4179°E	8,5	85000	0,68	57800
Ytteröfladan	59.9069°N 23.6139°E	8,06	80600	1,53	123318
Roliggropen	62.812°N 21.158°E	1,7	17000	0,3	2276
Backfladan	63.205°N 21.424°E	5,42	54186	0,59	31970
Backfladan taka-allas	63.205°N 21.424°E	0,85	8473	0,3	2542

Jokaisessa kohteessa pienvesistöstä kerättiin kokoomanäyte ottamalla viidestä kohdasta viisi litraa vettä, jotka sekoitettiin yhteen (5 x 5 = 25 litraa). Tästä kokoomanäytteestä tehtiin painovoimainen esisuodatus 300µm verkkokankaalla roskien poistamiseksi. Tämän jälkeen suoritettiin varsinaiset näytesuodatukset, joita tehtiin kolme kustakin kokoomanäytteestä. Suodatusvälineistönä käytettiin Smith-Root®:n valmistamaa eDNA-näytteenottoon tarkoitettua pumpullista reppukerääjää (Smith-Root 2022) (Kuva 5).



Kuva 5. eDNA-näytteenotossa käytetty pumpullinen reppukerääjä (Kuva Luonnonvarakeskus).

Laitte mittasi näytettä otettaessa vedenpaineen, veden virtausnopeuden ja näytevolyymin. Laitteessa käytetään vesistönäytetarkoitukseen kehitettyä kertakäyttöistä eDNA-keräysfilteriä, jonka partikkelien suodatuskoko oli $5\mu\text{m}$ (Smith-Root 2022). Keräysfilteristä eristettiin DNA laboratoriossa. Lisäksi näytesuodatuksia tehtiin maastossa puhtaasta vedestä negatiivisten kontrollinäytteiden saamiseksi. DNA-eristyksessä näytteitä oli yhteensä 99 (Liite 1).

2.2 DNA-eristys

DNA-eristys aloitettiin irrottamalla laminaarivirtauskaapissa keräysfilterit yksitellen suodatuskapselin sisältä, jonka jälkeen ne siirrettiin taitellen 2ml eppendorf-putkiin (Kuva 6). Näytteisiin lisättiin natriumasetatin ja alkoholin sekoitus ($45\mu\text{l NaOac 3M pH 5,2}$, $1000\mu\text{l}$

Aa) DNA:n saostamiseksi keräysfilttereistä, jonka jälkeen näytteet vorteksoitiin ja homogenisoitiin (4,0m/s 20s * 2 FastPrep®-24 MP Biomedicals). Tämän jälkeen näytteet siirrettiin -20°C saostumaan vähintään 12 tunniksi.



Kuva 6. DNA-eristyksessä käytetty keräysfiltri eristyskaapissa, kun suojakapseli on purettu ympäriltä (Kuva Luonnonvarakeskus).

Seuraavaksi näytteille toistettiin vorteksointi ja homogenisointi käsittely, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin (13000rpm 1min. +4°C). Näyteputkista poistettiin keräysfiltri, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin uudelleen (13000rpm 30min. +4°C). Näytteiden päältä poistettiin pipetoiden supernatantti ja näytteiden käsittelyä jatkettiin kaupallisella kitillä (QIAGEN DNeasy® Blood & Tissue Kit), joka sisälsi valmiit reagenssit ja pylväsmatriksit silikakalvoilla. Näytteistä hajotettiin solut ja proteiinit nukleiinihappojen vapauttamiseksi, lyysis-

puskurin ja proteinaasi K:n avulla (180µl ATL-puskuri, 20µl Proteinaasi K). Näytteet vorteksoitiin ja siirrettiin inkuboitumaan kolmeksi tunniksi (+56°C VWR Incubated Mini Shaker). Tämän jälkeen näytteitä vorteksoitiin, jonka jälkeen niihin lisättiin puskuriliuos ja siirrettiin inkuboitumaan kymmeneksi minuutiksi (200µl AL-puskuri, +70°C QBT1 Grant Instruments). Näytteitä saostettiin lisäämällä jääkylmää absoluuttista etanolia (200µl Aa) ja vorteksoimalla.

Seuraavaksi DNA puhdistettiin valmiiden puskuriliuosten ja silikapylväiden avulla. Näytteet siirrettiin silikakalvollisiin pylväsmatriiseihin ja puskuriliuos sentrifugoitiin keräysputkeen (8000rpm 1min RT, eli huoneenlämpö (room temperature)). Keräysputkeen kertyneet jäteneesteet tyhjennettiin, DNA:n keräysmatriisiin päälle lisättiin pesupuskuriliuos ja sentrifugoitiin (500µl AW1-puskuri, 8000rpm 1min RT). Keräysputki tyhjennettiin, näytteisiin lisättiin toinen pesupuskuriliuos ja sentrifugoitiin (500µl AW2-puskuri, 13200rpm 3min RT). Pylväsmatriisi siirrettiin uuteen keräysputkeen ja sentrifugoitiin jälleen; etanoli ja muiden puskurijäämien poistamiseksi (13200rpm 1min RT).

Lopuksi silikakalvoille pipetoitiin 50 µl AE-puskuria ja putkia inkuboitiin 1 minuutti huoneenlämmössä. Tämän jälkeen pylväät asetettiin puhtaisiin 1,5ml eppendorf-putkiin ja sentrifugoitiin (8000rpm 1min), jolloin puhdistettu DNA päätyi 1,5ml eppendorf-putkeen. Näytteille tehtiin vielä lisäeluointi uuteen puhtaaseen eppendorf-putkeen, jotta kaikki DNA saatiin talteen (30µl AE-puskuri, 1min RT, 8000rpm 1min). Valmiita DNA-näytteitä säilytettiin -20°C lämpötilassa.

2.3 Menetelmän optimointi – gradientti-PCR

Kirjallisuuden perusteella alukepariksi valikoitui ahvenspesifi, alkupään "forward" Per-flu-S671 GTACCGGGTGAAGTGTATATCCG ja vastakkainen "reverse" Per-flu-A671 CAGGGTCAAAGAAAGTTGTGTTC. Alukkeiden kohdegeeni oli mitokondriossa sijaitseva niin kutsuttu DNA-viivakoodigeeni (COI), josta monistettiin 300bp pituinen alue (Thalinger ym. 2015). Gradientti-PCR:n avulla haettiin käytetyille alukkeille optimaalinen kiinnittymislämpötila "annealing temperature" (Taulukko 2).

Taulukko 2. Gradientti-PCR-ohjelma ja alukkeiden kiinnittymislämpötilat (engl. *annealing*) välillä 58–68°C. Tarkat lämpötilat erotettu taulukossa kauttaviivoin.

	Vaihe	Lämpötila °C	Kesto	Toisto
1	alkudenaturaatio	95	2min	1
	denaturaatio	95	15s	
2	annealing	58-68 (58/58,7/60/62/64, 4/66,4/67,5/68)	30s	50
	ekstensio	72	30s	
3	loppuekstensio	45	10min	1
4	pito	4	∞	

Optimointivaiheessa käytetty näytemateriaali oli ahvenen kudoksesta eristettyä DNA:ta, jonka DNA-pitoisuus oli 4ng/μl. Vertailuun käytettävät positiivinen ja negatiivinen kontrollinäyte muodostuivat useiden kalalajien kokoomanäytteistä, joista positiivisessa oli ahvenen DNA mukana (mix+) ja negatiivisessa ei (mix-) (Liite 2). PCR-reaktion optimoinnissa käytettiin QIAcuity® EG PCR Kittiä, joka sisälsi valmista reaktioseosta ”3x QN EvaGreen dPCR MM” ja RNAasi vapaata vettä, sekä kirjallisuuden perusteella valikoituja ahvenspesifejä alukkeita ”aluke for. Per-flu-S671” ja aluke rev. Per-flu-A671 (Taulukko 3).

Taulukko 3. Optimoinnissa käytetty reaktioseos. Valmis reaktioseos (3x QN EvaGreen dPCR MM), RNAasi vapaa vesi, ahvenspesifit alukkeet: alkupään aluke (aluke for. Per-flu-S671) ja käänteiseen suuntaan (aluke rev. Per-flu-A671) Alukkeiden loppukonsentraatio reaktioseoksessa on 0,2μM.

Reagenssi	1x määrä (μl)
3x QN EvaGreen dPCR MM	2
Aluke for. Per-flu-S671 4μM	0,3
Aluke rev. Per-flu-A671 4μM	0,3
RNAasi vapaa vesi	2,4
Templaatti	1
Yhteensä	6

Gradientti-PCR:n valmiiden DNA-tuotteiden tunnistamisessa hyödynnettiin agarosigeelielektroforeesia. Etidiumbromidi-merkkiaineella leimattu jähmettynyt 1 %-agarosigeeli, asetettiin ajoaltaaseen, joka täytettiin samalla 1XTBE-puskurilla (Tris-boraatti-EDTA), johon geeli oli valmistettu. Tuotteita pipetoitiin agarosigeelille 5μl per kaivo. Tuotteiden

fragmenttikoon määrittämiseksi ajoon lisättiin 100bp molekyylipainomarkkeri eli ”ladder” (Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp DNA Ladder). Tuotteita ajettiin geelillä 30-minuuttia 90voltin jännitteellä. Tämän jälkeen geeli poistettiin ajoaltaasta ja kuvattiin UV-valon avulla.

2.4 Menetelmän optimointi - qPCR

Menetelmän toimivuus ja lajispesifisyys testattiin vielä qPCR-menetelmää hyödyntäen, laitteistona toimi Mic qPCR Cycler (Bio Molecular Systems). PCR-reaktioseos oli sama kuin gradientti PCR-menetelmässä (Taulukko 3). Näytteinä käytettiin kolmea rinnakkaista ahvenen kudoksesta eristettyä DNA-näytettä (pitoisuus 4ng/μl) ja siitä tehtyjä laimennoksia 1:25 (laskennallinen pitoisuus 0.16ng/μl) ja 1:100 (laskennallinen pitoisuus 0.04ng/μl). Lisäksi kontrollinäytteinä olivat samat seokset (mix+, mix-) kuin gradientti PCR:ssä ja nollänäytteenä vesi. qPCR-ohjelman loppuun lisättiin laskeva denaturaatio-lämpötila HRM-vaihe (high resolution melt), jonka avulla tutkittiin, onko käytetyt alukkeet lajispesifiset. (Taulukko 4).

Taulukko 4. Mic qPCR ohjelma, jonka lopussa laskeva denaturaatio-lämpötila (HRM).

	Vaihe	Lämpötila °C	Kesto	Toisto
1	alkudenaturaatio	95	2min	1
2	denaturaatio	95	15s	55
	annealing	63,5	30s	
	ekstensio	72	30s	
3	HRM	95	0,3°C/s	1
4	pito	4	∞	

2.5 eDNA-näytteiden analyysiajo - dPCR

Eristetyistä eDNA-näytteistä tehtiin kolme rinnakkaista analyysiajoa digitaali-PCR-laitteistolla (QIAGEN QIAcuity one with 5plex). Tämän lisäksi käytettiin positiivista kontrollia, joka oli eristetty ahvenen kudoksesta ja laimennettu vastaamaan paremmin eDNA-näyte pitoisuuksia (laskennallinen pitoisuus 0,02ng/μl). Jokaisessa analyysiajossa oli mukana kaksi negatiivista kontrollia. Ensimmäinen koostui PCR-reaktioseoksesta, jossa näytteenä oli puhdistettua vettä. Toisessa negatiivisessa kontrollissa oli sekoitettuna vain 3x QN EvaGreen dPCR MM (16,7μl) ja RNAasi-vapaa vesi (23,3μl). Lisäksi DNA:n eristysvaiheessa tehtyä laboratoriokontrollia käytettiin analyysiajossa. dPCR-reaktioseoksessa noudatettiin laitevalmistajan ohjeistusta (Taulukko 5, Qiagen 2021). PCR-ohjelman

valmistuttua laitteisto kuvasi välittömästi näytekaivoissa mahdollisesti syntyneet reaktiot (Exposure duration: 200ms ja Gain:3) (Taulukko 6).

Taulukko 5. PCR-reaktioseos. Valmis reaktioseos (3x QN EvaGreen dPCR MM), RNAasi vapaa vesi, ahvenspesifit alukkeet: alkupään aluke (aluke for. Per-flu-S671) ja käänteiseen suuntaan (aluke rev. Per-flu-A671). Alukkeiden loppukonsentraatio reaktioseoksessa on 1,3µM.

Reagenssi	1x määrä (µl)
3x QN EvaGreen dPCR MM	13,33
Aluke for. 4µM	2
Aluke rev. 4µM	2
RNAasi-vapaa vesi	14,67
Templaatti	8
Yhteensä	40

Taulukko 6. dPCR-ohjelma.

	Vaihe	Lämpötila °C	Kesto	Toisto
1	alkudenaturaatio	95	2min	1
2	denaturaatio	95	15s	50
	annealing	63,5	30s	
	ekstensio	72	30s	
3	loppuekstensio	45	10min	1
4	kuvaus	RT	15min	

2.6 Vertailuaineisto

Tutkimustyön vertailuaineistona käytettiin samoina näytteidenkeräysajankohtina tehtyjä ahventen rysäpyydysotantoja sekä ahventen poikasten ja ahventen mätinauhojen tiheysmittaustuloksia.

2.7 Analysointi

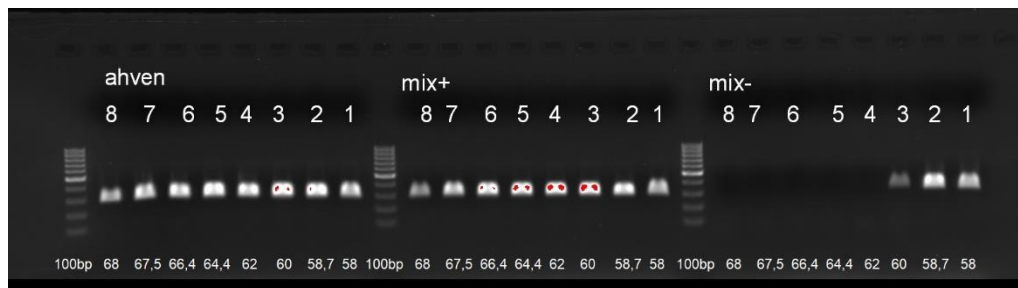
eDNA-tuloksia analysoitiin QIAcuity Software Suite -ohjelmistolla. Ohjelmisto laski PCR-ajon valmistuttua kaivoissa tapahtuneet reaktiot ja kopiolumäärät mikrolitroissa. Tulokset tarkasteltiin läpi ja tarvittaessa säädettiin ohjelmiston antamaa kynnyslinjaa "threshold". Lopulliseen tulosten analysointiin ei otettu mukaan näytteitä, joissa PCR-reaktion toiminta ei ollut optimaalista. PCR-ajon rinnakkaisnäytteistä ja maastossa

tehdystä rinnakkaisnäytesuodatuksista laskettiin keskiarvot. Vertailuaineiston tiheydet mädin ja poikasten osalta ovat kuutiolavuutena.

3. Tulokset

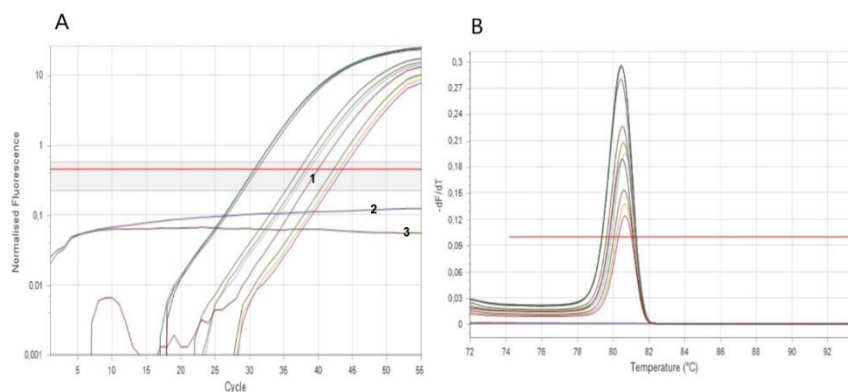
3.1 Optimointitulokset

Ennen varsinaisia eDNA-analyysiajoja menetelmää optimoitiin ahvenen kudoksenäytteistä eristetyn DNA:n ja siitä tehtyjen laimennosten avulla. Gradientti-PCR:n ja agarosigeelin avulla käytetyille alukkeille löytyi optimaalinen liittymislämpötila 62°C-asteesta (Kuva 7). Epäspesifin monistumisen välttämiseksi korotettiin lämpötila vielä 63,5°C asteeseen qPCR ja dPCR-analyysiajoihin dPCR-menetelmän herkkyyden vuoksi.



Kuva 7. Agarosigeelikuva gradientti PCR-tuotteista. Jokaisen sarjan vasemmassa reunassa 100bp-molekyylipainomarkkeri. Kaivojen gradientti PCR:n liittymislämpötilat 68 (8) 67,5 (7) 66,4 (6) 64,4 (5) 62 (4) 60 (3) 58,7 (2) 58 (1). Ahvenen kudoksenäyte (ahven), positiivinen kontrollinäyte (mix+) ja negatiivinen kontrollinäyte (mix-).

Menetelmän toimivuus ja lajispesifisyys testattiin vielä qPCR-menetelmää hyödyntäen. qPCR-ohjelman loppuun lisättiin denaturaatio-lämpötila, jonka avulla tutkittiin, onko käytetyt alukkeet lajispesifiset. Denaturaatio-lämpötila varmisti, että kaksijuosteisesta DNA:sta monistui vain yksi erillinen tuote (Kuva 8).



Kuva 8. Menetelmän optimoinnissa käytetty qPCR-analyysiajo (A) ja loppudenaturaatio (HRM) lämpötilan kurva (B). Näytteinä kolme rinnakkaista ahvenen kudoksesta eristettyä

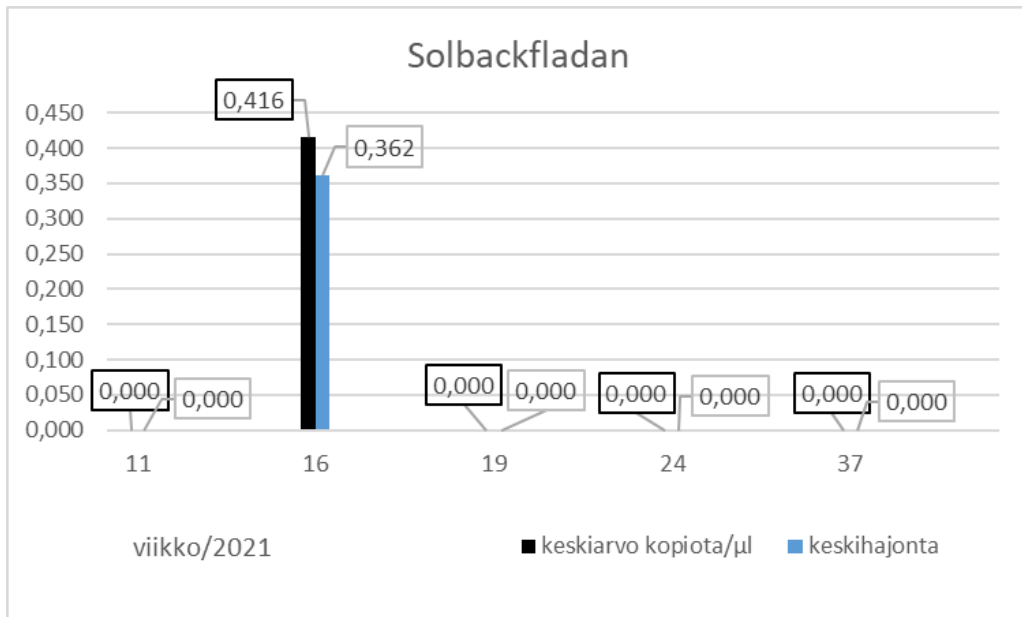
DNA:ta (pitoisuus 4ng/μl) ja siitä tehdyt laimennokset 1:25 (laskennallinen pitoisuus 0.16ng/μl) ja 1:100 (laskennallinen pitoisuus 0.04ng/μl), myös kolmena rinnakkaisena. Kontrollinäytteinä (mix+ 1), ja (mix- 2) ja nollanäytteenä vesi (3).

3.3 eDNA tulokset

Ympäristö-DNA näytesyödatuksia tehtiin jokaisella pienvesistökohteella kolme rinnakkaista yhdestä kokoomanäytteestä. Näistä suodatuksista eristettiin DNA ja ajettiin kolme rinnakkaista analyysiajoa digitaali-PCR-laitteiston avulla. Poikkeuksena rinnakkaisissa analyysiajoissa oli Solbackfladanin viikon 24 yksi kolmesta rinnakkaisesta näytesyödatuksesta, jossa DNA:ta ei ollut eluoitunut riittävää määrää pylväsmatriksin läpi DNA-erityksessä. Tästä näytteestä ajettiin ainoastaan yksi analyysiajo. Rinnakkaisia PCR-analyysiajoja verrattiin keskenään tulosten luotettavuuden lisäämiseksi. Näistä analyysiajoista sekä rinnakkaisista suodatuksista laskettiin keskiarvot. Rinnakkaisista suodatuksista laskettiin myös keskihajonta, josta nousee esille rinnakkaisten näytesyödatusten poikkeamat. Jokaisessa PCR-analyysiajossa mukana olleen ahvenen kudoksesta eristetyn, positiivisen kontrollin tuloskeskiarvoksi digitaali-PCR-laitteistolla tuli 26,388 kopiota/μl templaatti DNA:ta. Puhtaasta vedestä tehdyt näytesyödatukset negatiivisina kontrollinäytteinä olivat negatiivisia, kuten myös negatiivinen laboratoriokontrolli ja negatiiviset PCR-reaktioseos kontrollit.

3.3.1 Solbackfladan

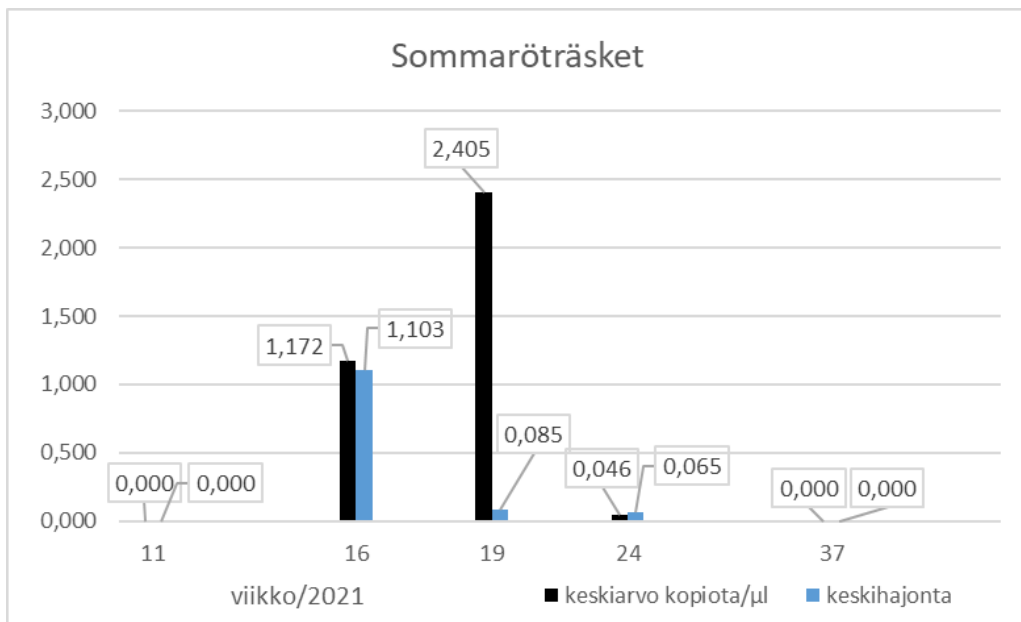
Suomenlahdella sijaitsevan Solbackfladanin vesistöistä suodatettujen näytteiden vesitilavuus suodatusta kohden oli keskimäärin 2,67 litraa. Ympäristö-DNA tuloksissa havaittiin ahvenen DNA:ta huhtikuun 2021 näytteissä, viikolla 16. Muina ajankohtina tehdyistä näytesyödatuksista ei löytynyt ahvenen DNA:ta (Kuva 9).



Kuva 9. Suomenlahden Solbackfladanin ympäristö-DNA näytepitoisuuksien keskiarvot (templaatti DNA kopiota/μl) ja keskihajonnat rinnakkaisista näytesyödatuksista.

3.3.2 Sommaröträsket

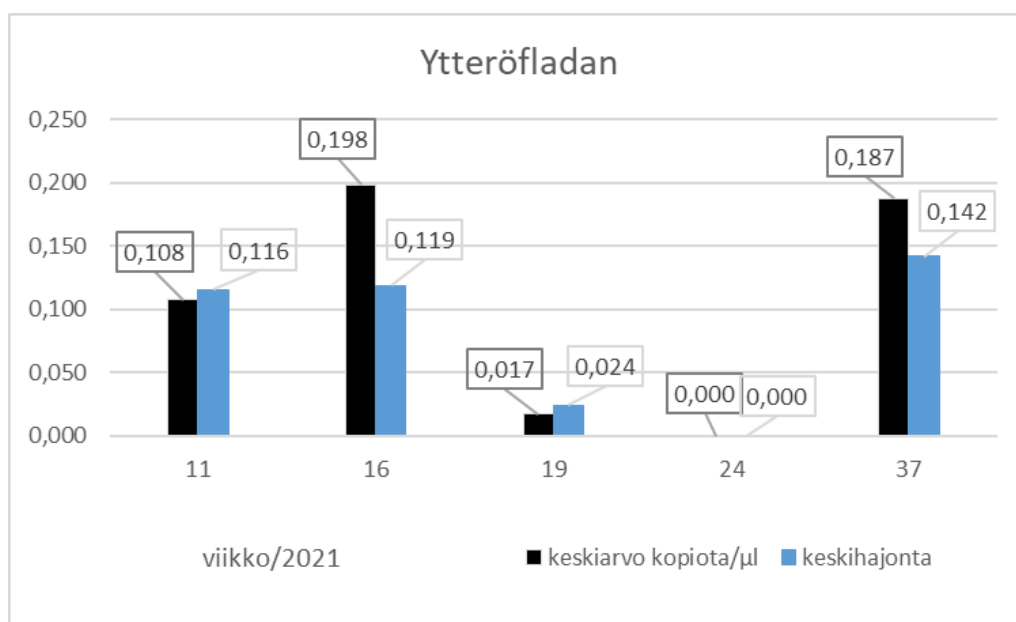
Toisessa Suomenlahden kohteessa, Sommaröträsket kluuvissa, vesistöstä suodatettujen näytteiden vesitilavuus suodatusta kohden oli keskimäärin 2,46litraa. Kohteen ympäristö-DNA pitoisuudet nousevat huhtikuun viikolla 16, ja jatkavat nousua toukokuun viikolle 19. Tämän jälkeen pitoisuudet lähtevät laskuun (Kuva 10).



Kuva 10. Suomenlahden Sommaröträsketin ympäristö-DNA näytepitoisuuksien keskiarvot (kopiota/μl) ja keskihajonnat rinnakkaisista näytesyödatuksista.

3.3.3 Ytteröfladan

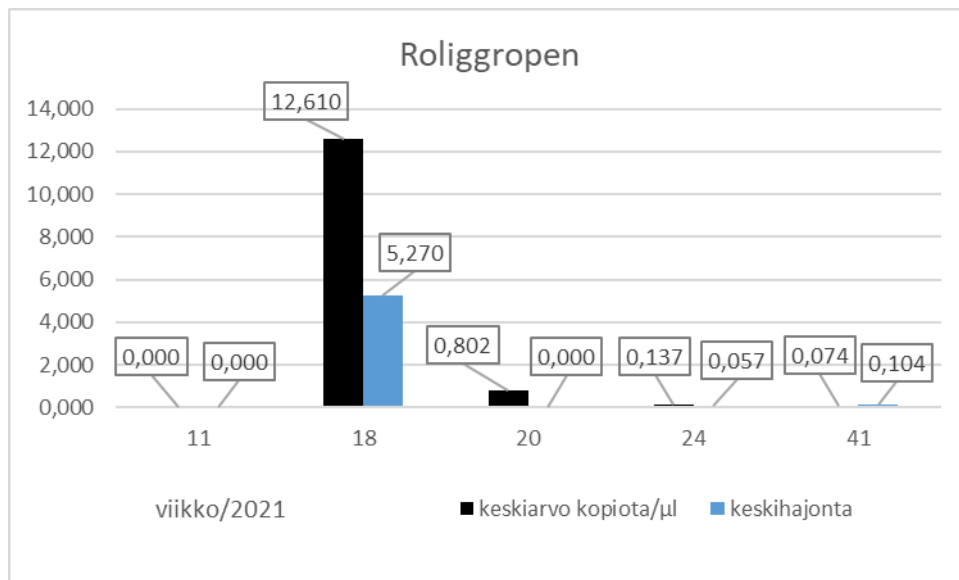
Ytteröfladan pienvesistöstä suodatettujen näytteiden vesitilavuus suodatusta kohden oli keskimäärin 2,38litraa. Kohteessa ympäristö-DNA:ta havaittiin jo ensimmäisestä näytteenottoviikosta lähtien (maaliskuu viikko 11). Pitoisuudet jatkavat kasvua huhtikuun viikolle 16, kuten muissakin Suomenlahden kohteissa. Tämän jälkeen pitoisuudet laskevat. Ytteröfladan on toinen kohteista, joissa ympäristö-DNA pitoisuudet kohoavat jälleen syksyllä, lähes kevään pitoisuuksien tasolle (Kuva 11).



Kuva 11. Suomenlahden Ytteröfladanin ympäristö-DNA näytepitoisuuksien keskiarvot templaatti DNA kopiota/µl vasemmalla ja oikealla keskihajonnat rinnakkaisista näytesyodatuksista.

3.3.4 Roliggropen

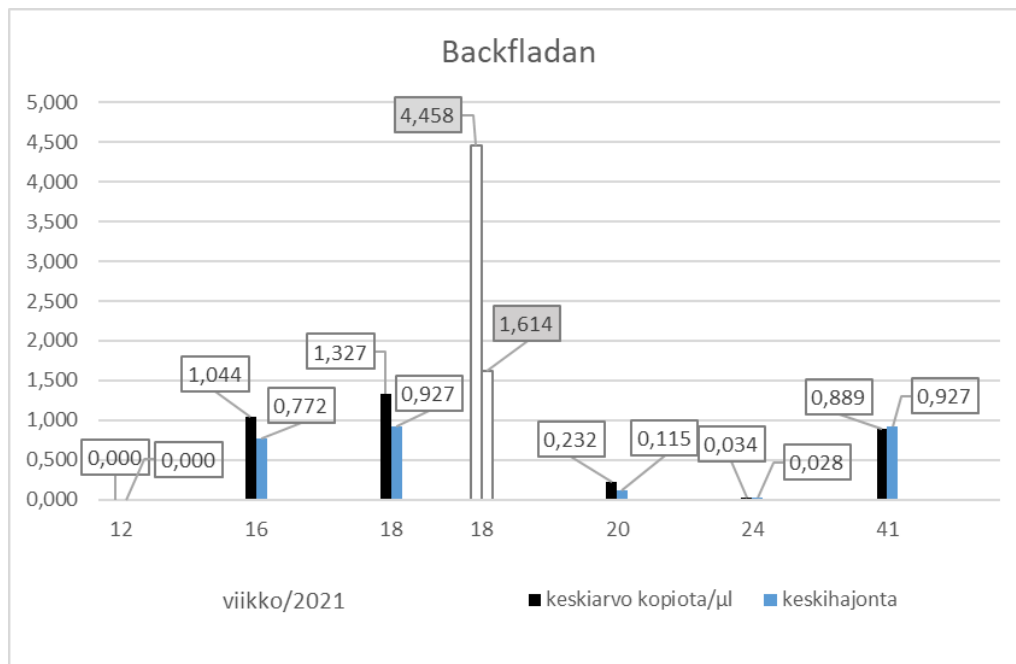
Merenkurkulla sijaitsevan Roliggropenin vesistöstä suodatettujen näytteiden vesitilavuus suodatusta kohden oli keskimäärin 1,25litraa. Tilavuus on noin 1litran pienempi, kuin Suomenlahden kohteissa. Roliggropenin ympäristö-DNA analyysiajojen tulokset poikkesivat muiden kohteiden tuloksista inhiboituneiden näytteiden määrässä. Huhtikuun viikon 16 rinnakkaisista näytesyodatuksista ei ole tuloksia mukana ollenkaan. DigitaalPCR-laitteisto ei onnistunut saamaan näistä näytteistä luotettavia tuloksia yhdestäkään rinnakkaisesta analyysiajosta. Sama ongelma toistui toukokuun viikon 20 näytesyodatuksissa, joista ainoastaan yksi kolmesta rinnakkaisesta suodatuksesta onnistui PCR-analyysiajossa. Roliggropenin osalta ympäristö-DNA pitoisuudet ovat muihin kohteisiin verrattaen korkealla toukokuun alun viikolla 18 ja laskevat tämän jälkeen kohti syksyä (Kuva 12). Viikolla 10 tehty yksittäinen näytesyodatus antoi tulokseksi 0,000ng/µl. Tämä näyte oli testisyodatus pumpullisen reppukerääjän toiminnan varmistamiseksi, eikä siksi ole mukana varsinaisissa tuloksissa.



Kuva 12. Merenkurkun Roliggropenin ympäristö-DNA näytepitoisuuksien keskiarvot (kopiota/μl) ja keskihajonnat rinnakkaisista näytesyödatuksista.

3.3.5 Backfladan

Merenkurkun toisesta pienvesistökohteesta Backfladanista suodatettujen näytteiden vesitilavuus suodatusta kohden oli keskimäärin 1,75litraa. Siellä ympäristö-DNA pitoisuudet nousivat huhtikuun viikolla 16, kuten muissakin kohteissa. Pitoisuudet jatkavat kohoamista toukokuun viikolle 18, jonka jälkeen laskevat. Backfladanin osalta havaitaan samankaltainen ympäristö-DNA pitoisuuksien nousu syksyllä, kuin Suomenlahden Ytteröfladanissa. Backfladan flada on jakautunut kahteen altaaseen, joilla on kulkuyhteys toisiinsa. Tästä syystä toukokuun alun viikolla 18 niin kutsutusta taka-altaasta on otettu erilliset kolme rinnakkaista näytesyödatusta, jotka osoittavat suurempia ympäristö-DNA pitoisuuksia, kuin etuallas, josta on yhteys mereen (Kuva 13).

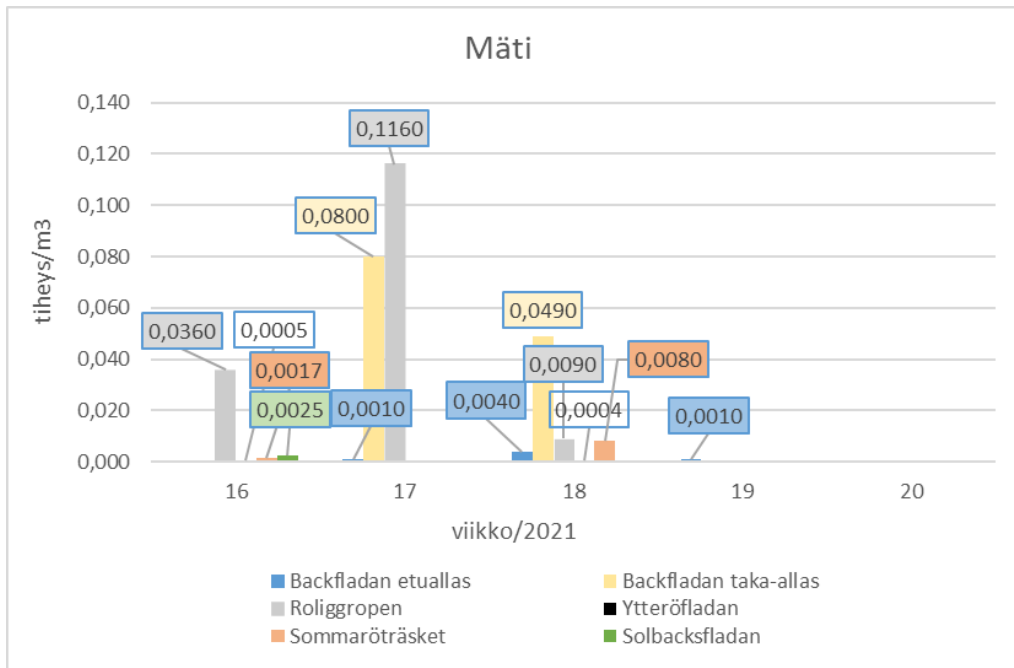


Kuva 13. Merenkurkun Backfladanin ympäristö-DNA näytepitoisuuksien keskiarvot (kopiota/μl) ja keskihajonnat rinnakkaisista näytesyödatuksista. Valkoiset, viikon 18 pylväät ovat Backfladanin taka-altaan erillisten näytesyödatusten keskiarvo (vasen) ja keskihajonta (oikea).

3.4 Vertailuaineiston tulokset

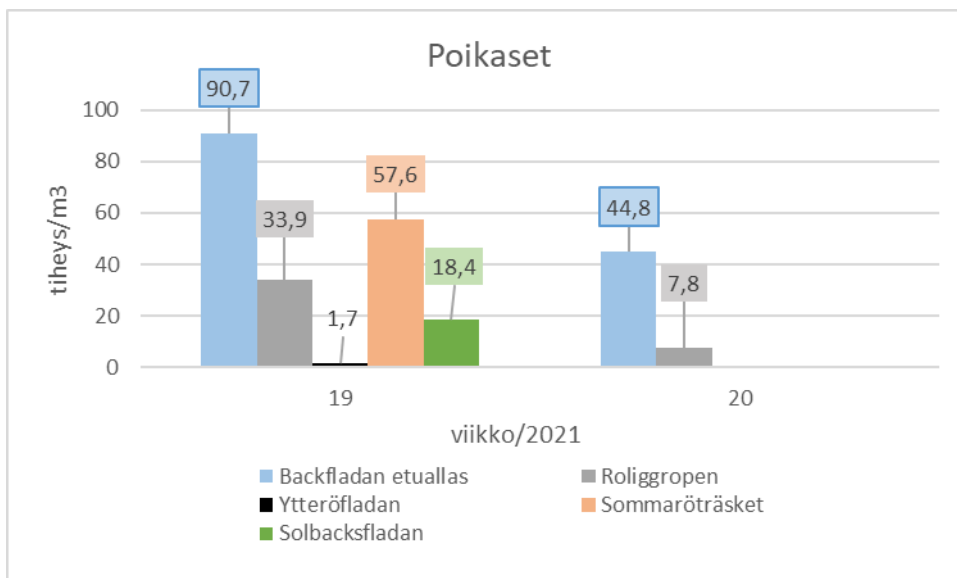
Vertailuaineiston tiheysmittaustulokset on saatu valmiina Luonnonvarakeskuksen tutkijoilta. Tiheysmittaustulokset ahventen mätinauhojen ja poikastiheyksien osalta ovat kuu-
tiotilavuuksina. Täysikasvuisia ahvenia pyydettiin rysäpyydyksellä otantaa varten.

Kaikissa viidessä pienvesistökohteessa tehtiin ahventen mätinauhojen tiheyslaskentaa kevään ja kesän 2021 aikana. Tiheydet vaihtelivat 0,0004 ja 0,1160 (tiheys/m³) välillä. Suurimmat mätitiheydet mitattiin Merenkurkun alueella Roliggropenin kluuvissa ja pienimmät Suomenlahden Ytteröfladanin fladassa (Kuva 14).



Kuva 14. Ahvenen mädin tiheysmittaustulokset pienvesistökohteista.

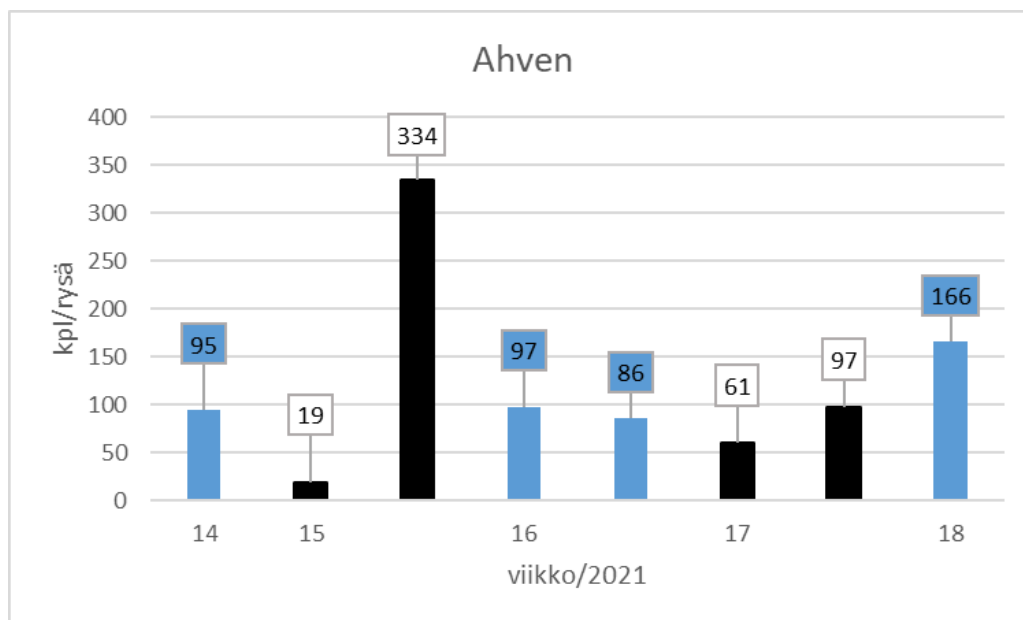
Jokaisessa viidessä pienvesistökohteessa tehtiin lisäksi toukokuun puolen välin jälkeen ahvenen poikasten tiheyslaskentaa. Merenkurkun Backfladanissa mitattiin suurimmat poikastiheydet ja Suomenlahden Ytteröfladanissa pienimmät (Kuva 15).



Kuva 15. Ahvenen poikasten tiheysmittaustulokset pienvesistökohteissa.

Merenkurkun Backfladan oli ainoa kohde, josta kevään 2021 ajalta on mitattu myös täysikasvuisten ahventen lukumääriä rysäpyydyksellä. Tulokset ovat suuntaa antavia

otantoja kyseisinä ajankohtina, koska rysäpyydykseen jää kaikki kalalajit, joita fladassa esiintyy. Huhtikuun puolivälissä viikolla 15 rysäpyydykseen jäi eniten täysikasvuisia ahvenia, jonka jälkeen määrä alkoi laskea ja nousi jälleen hieman toukokuun alussa viikolla 18 (Kuva 16).



Kuva 16. Täysikasvuisten ahventen kappalemäärät rysäpyydyksellä Merenkurkun Backfladanissa keväällä 2021 viikoilta 14–18.

3.5 Tulosten yhteenveto

Kaikissa viidessä pienvesistökohteessa löydettiin eDNA-menetelmän avulla ahvenen DNA:ta. Huhti-toukokuun vaihteessa, viikoilla 16–19 pitoisuudet olivat suurimmat jokaisessa kohteessa ja lähtivät tämän jälkeen laskuun. Osassa kohteista pitoisuudet nousivat uudelleen syksyllä syys-lokakuun vaihteessa, viikoilla 37–41. Suurimmat eDNA-pitoisuudet tulivat Suomenlahden Sommaröträsketistä ja Merenkurkun kohteista. Viikolla 16 Suomenlahden kohteissa esiintyi mätinauhoja ja samalta viikolta saatiin myös eDNA-pitoisuuksia. Viikoilla 18–20 Sommaröträsketistä, Roliggropenista ja Backfladanista saatiin eDNA pitoisuuksia, samoina ajankohtina kohteista mitattiin sekä ahvenen mätinauhoja että ahvenen poikasia. Backfladanissa rysäpyydyksellä tehtyjen aikuisten ahventen otantojen suurimmat määrät ajoittuvat ajalle ennen eDNA-pitoisuuksien nousua (Taulukko 7).

Taulukko 7. Jokaisessa pienvesistökohteessa tehtyt eDNA-tulokset (kopiota/ μ l), mäti- ja poikastiheysmittaustulokset (tiheys/ m^3), sekä aikuisten ahventen rysäpyyntitulokset (kpl) vuoden 2021 viikoilla 11–41. Poikasten tiheysmittauksia tehtiin ainoastaan Roliggropenissa ja Backfladanissa. Aikuisten ahventen rysäpyydystulokset ovat vain

Backfladanista. Backfladanin värikoodatut kauttaviivalla erotetut pitoisuudet eDNA ja mäti tuloksissa ovat erillisten vesistöaltaiden tulokset. Vasemmalla Backfladanin etualtaan tulokset ja oikealla taka-altaan. Aikuisten ahventen osalta, kauttaviivalla erotetut harmaalla merkatut kappalemäärät kertovat kahdesta eri rysäpyydysotannasta.

Viikko/2021		11	12	14	15	16	17	18	19	20	24	37	41
Solbackfladan	eDNA	0,000				0,416			0,000		0,000	0,000	
	mäti					0,0025							
	poikanen								18,4				
Sommarö-träsket	eDNA	0,000				1,172			2,405		0,046	0,000	
	mäti					0,0017		0,0080					
	poikanen								57,6				
Ytteröfladan	eDNA	0,108				0,198			0,017		0,000	0,187	
	mäti					0,0005		0,0004					
	poikanen								1,7				
Roliggruppen	eDNA	0,000						12,610		0,802	0,137		0,074
	mäti					0,0360	0,1160	0,0090					
	poikanen								33,9	7,8			
Backfladan	eDNA		0,000			1,044		1,327 / 4,458		0,232	0,034		0,889
	mäti						0,0010/0,0800	0,0040/0,0490	0,0010				
	poikanen								90,7	44,8			
	ahven			95	19 / 334	97 / 86	61 / 97	166					

4. Pohdinta

4.1 Ympäristö-DNA-pitoisuuksien ajankohdat

Tämän tutkimuksen eDNA-pitoisuudet nousevat samoina tai hyvin lähellä ajankohtia, jolloin pienvesistökohteissa on saatu suurimmat kalamäärät perinteisillä menetelmillä suoritetuissa mätinauhojen ja poikasten tiheysmittaustuloksissa. Aikaisemmin aikuisilla kaloilla ja sen poikasilla tehtyjen allaskokeiden perusteella eDNA-pitoisuus korreloi vahvasti biomassan kanssa. Pitoisuudet nousevat suuremmiksi sitä nopeammin, mitä suurempi määrä kaloja on vedessä. Jo 24 tunnin jälkeen havaitaan eDNA-pitoisuuksia, jotka alkavat hyvin nopeasti myös laskea, kun kalat poistetaan vedestä. Lisäksi aikuisista kaloista irtoaa huomattavasti suurempi määrä DNA:ta ympäristöön, verrattuna poikasiin (Karlsson ym. 2022; Lacoursière-Roussel ym. 2016; Maruyama ym. 2014; Sansom ja Sassoubre 2022). Tämä viittaisi siihen, että tämän tutkimuksen viikolla 16 saadut eDNA-pitoisuudet saattavat kohota myös aikuisten ahventen vaikutuksesta, jotka nousevat suurissa määrin fladoihin ja kluuveihin kutemaan. Tähän viittaa myös Backfladanista saadut rysäpyydysotantamäärät aikuisista ahvenista, mitkä olivat korkeimmat ennen eDNA-pitoisuuksien kohoamista.

eDNA-pitoisuudet ovat korkealla myös viikoilla 18–19, joka on lähellä ajankohtaa, jolloin fladoissa ja kluuveissa on paljon ahvenen poikasia. Poikkeuksena Solbackfladan, jossa ahvenen poikasia oli runsaasti, mutta samaan aikaan ei saatu eDNA:sta korreloivia tuloksia. Ytteröfladanissa mitattiin muista kohteista poiketen viikolla 11 eDNA-pitoisuuksia. Tämä todennäköisesti johtuu kuolleista ahvenista. Maaliskuun puolivälissä vesistö oli jääsohjon peitossa, talven aikana matala vesi jäätyy syvältä sekä muuttuu happipitoisuudeltaan niin pieneksi että sinne jääneet ahvenet kuolevat (Liite 3).

4.2 Vesistöjen ominaisuuksien vaikutukset tuloksiin

Tutkimuksessa ilmeni useita 0-tuloksia, vaikka pienvesistökohteissa on kuitenkin kevään ja syksyn välisenä aikana aina jonkin verran ahvenia. Onkin hyvä ottaa huomioon vesistön ominaisuuksien vaikutukset eDNA-tuloksien arvioinnissa. UV-säteily, veden pH-arvo ja lämpötila vaikuttavat eDNA:n hajoamiseen (Strickler ym. 2015). Pienvesistökohteissa veden syvyys on matala, joten kevät auringon UV-säteilyllä saattaa olla jonkin verran vaikutusta DNA:n säilymiseen tai hajoamiseen kohteissa. Mitä lähempänä pH-arvo on neutraalia ja hapanta, sitä nopeammin DNA hajoaa. Tutkimuksen pienvesistökohteissa pH-arvo pysyy lievästi emäksisen puolella, joten pH:lla ei ole suurta vaikutusta tuloksiin

(Liite 3). Kylmässä vedessä DNA säilyy pidempään, aikaisin keväällä tämän tutkimuksen pienvesistökohteiden veden lämpötila säilöo DNA:ta paremmin kuin kesällä.

4.3 Näytesuodatukset, DNA-eristys ja PCR-analyysiajo

Osa PCR-analyysiajoista epäonnistui, johtuen mahdollisesti DNA-näytteen mukana tulleista PCR-reaktiota inhiboineista aineista. Veden sameutta seisovissa vesissä aiheuttava humuspitoinen maa-aines aiheuttaa inhibiittoreita ympäristö-DNA-näytteissä (Lance & Guan, 2020). Pienvesistökohteissa tällaisen maa-aineksen sekoittuminen veteen on hyvin todennäköistä. Matalissa seisovissa vesissä, maa-aines lähtee sateen mukana ja runsaan kalamääränkin liikkeistä sekoittumaan veteen. DNA:n eristämiseen on käytössä useita menetelmiä ja tietyn menetelmän optimointi eDNA:lle todennäköisesti parantaisi DNA-saantoa ja minimoisi inhiboivien aineiden määrää ja vaikutusta PCR-reaktioon.

eDNA-kokoomanäytteet on kerätty alueiden reunoilta. Osassa kohteista mätinauhat olivat pääsääntöisesti reuna-alueilla, kun taas toisissa tasaisesti levinneenä alueelle. Tällä voi olla vaikutusta eDNA-pitoisuuksiin mätitiheyksien osalta, koska mätinauhojen DNA ei välttämättä leviä suhteellisen seisovissa vesissä ympärilleen, toisin kuin liikkeessä olevien kalojen ja poikasten. Vedessä eDNA-pitoisuuksien on todettu heikkenevän, mikäli näyte otetaan kaukana liikkumattomana olevasta kohteesta (Gasparini ym., 2020).

Ympäristö-DNA:n oletetaan olevan melko fragmentoitunutta, ja sen havaitsemiseen sopisi parhaiten käytettäväksi alle 100bp fragmenttikoot PCR-analyysiajossa (Rees ym. 2014). Tämä kuitenkin hankaloittaa lajispesifisyydessä pysymistä, mutta auttaisi vähentämään vääriä negatiivisia vastauksia.

eDNA-menetelmän käyttöön olisi tärkeää saada yhtenäisempiä käytäntöjä, käyttökohteitten mukaan. Menetelmässä on suuri potentiaali biodiversiteetin tarkkailuvälineenä ja ympäristön valvonnassa (Loeza-Quintana ym., 2020; Pawlowski ym., 2021).

4.3 Jatkotutkimusmahdollisuudet

eDNA-menetelmää ahventen seurannassa olisi mahdollista jatkotutkimuksen avulla kehittää. Tutkimuksessa tulisi selvittää rinnakkaisten näytesuodatusten poikkeamien syyt esimerkiksi eri laatuisten vesistönäytteiden avulla. Lisäksi olisi hyvä testata, hyötyisikö

inhiboituneet näytteet DNA:n lisäpuhdistuksesta DNA-eristys vaiheessa. eDNA-näyte-suodatusten esisuodatuksen tekemistä tiheämmällä verkolla voisi harkita, tällä voisi olla vaikutusta myös eDNA-filtterin läpi suodattuvan veden määrässä.

Jotta voitaisiin varmemmin seurata eDNA:n avulla ahventen esiintymistä fladoissa ja kluuveissa, tulisi selvittää miten mätitiheydet ja poikastiheydet korreloivat eDNA-pitoisuuksien kanssa. Tämä onnistuisi allaskokeilla, jossa mukana olisi eri aikapiste suodatukset ahvenista, mädistä ja poikasista. Lisäksi väärin negatiivisten tulosten välttämiseksi pienemmän fragmenttikoon käyttöä PCR-reaktiossa voisi selvittää menetelmän lisäoptimoinnin avulla.

4.4 Tutkimustulosten merkitys

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, voidaanko eDNA-menetelmää hyödyntää ahvenkannan ja poikatuotannon määrien arvioinnissa. eDNA:n avulla pystytään seuraamaan lajin esiintymistä pienvesistökohteissa. eDNA:n avulla pystytään myös seuraamaan vaihtelevuutta DNA-pitoisuuksissa ja osittain korreloimaan sitä biomassaan. Ahven on kuitenkin yleinen laji näillä alueilla, joten tarkempia tietoja biomassan suhteen tarvitaan, jotta tuloksista voitaisiin luotettavammin arvioida eDNA-pitoisuuksien suhdetta aikuisiin ahveniin, mätiin ja poikasiin. Menetelmän kehityksellä ja lisätutkimuksella eDNA-menetelmää saattaisi pystyä hyödyntämään ahvenkannan ja poikatuotannon määrien arvioinnissa.

KIITOKSET

Haluan erityisesti kiittää ohjaajiani Terhi Iso-Tourua ja Eero Vesteristä asiantuntevasta ohjauksesta ja mahtavasta kannuksesta tutkielman teossa. Lisäksi kiitän Luonnonvarakeskusta Pro gradu -työn mahdollistamisesta, sekä Jokioisten toimipisteen henkilökuntaa tuesta ja hyvästä seurasta laboratoriotyön lomassa. Kiitokset myös Lari Venerannelle, Antti Lappalaiselle ja Mats Westerbomille vertailuaineiston tarjoamisesta ja tuesta. Kiitän vanhempiani ja siskojani lapsenvahti avusta, ystäviäni kannuksesta ja omaa perhettäni siitä, että sain työskentelyn lomassa ajatustaukoja ja paljon naurun täyteisiä hetkiä.

Lähteet

- Barnes, M., & Turner, C. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17, 1–17.
- Coble, A., Flinders, C., Homyack, J., Penaluna, B., Cronn, R., & Weitemier, K. (2019). eDNA as a tool for identifying freshwater species in sustainable forestry: A critical review and potential future applications. *Science of The Total Environment*, 649, 1157–1170.
- Cowart, D., Murphy, K., & Cheng, C. (2018). Metagenomic sequencing of environmental DNA reveals marine faunal assemblages from the West Antarctic Peninsula. *Marine Genomics*, 37, 148–160.
- Deagle, B., Jarman, S., Coissac, F., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2014). DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: not a perfect match. *Biology Letters*, 10.
- Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., & Miaud, C. (2011). Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. *PLoS ONE*, 6.
- Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E., & Miaud, C. (2012). Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology*, 49, 953–959.
- Doi, H., Uchii, K., Takahara, T., Matsushashi, S., Yamanaka, H., & Minamoto, T. (2015). Use of Droplet Digital PCR for Estimation of Fish Abundance and Biomass in Environmental DNA Surveys. *PLOS ONE*, 10.
- Ficetola, G., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4, 423–425.
- Foote, A., Thomsen, P., Sveegaard, S., Wahlberg, M., Kielgast, J., Kyhn, L., Salling, A., Galatius, A., Orlando, L., & Gilbert, M. (2012). Investigating the Potential Use of Environmental DNA (eDNA) for Genetic Monitoring of Marine Mammals. *PLoS ONE*, 7.
- Fuks, G., Elgart, M., Amir, A., Zeisel, A., Turnbaugh, P., Soen, Y., & Shental, N. (2018). Combining 16S rRNA gene variable regions enables high-resolution microbial community profiling. *Microbiome*, 6, 17.

- Gasparini, L., Crookes, S., Prosser, R., & Hanner, R. (2020). Detection of freshwater mussels (Unionidae) using environmental DNA in riverine systems. *Environmental DNA*, 2, 321–329.
- Goldberg, C., Sepulveda, A., Ray, A., Baumgardt, J., & Waits, L. P. (2013). Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, 32, 792–800.
- Hunter, M., Oyler-McCance, S., Dorazio, R., Fike, J., Smith, B., Hunter, C., Reed, R., & Hart, K. (2015). Environmental DNA (eDNA) Sampling Improves Occurrence and Detection Estimates of Invasive Burmese Pythons. *PLOS ONE*, 10.
- Hynninen M., Veneranta L., & Lappalainen A. (2019). Fladojen, kluuvien ja kluuvijärvien kalataloudelliset kunnostukset Merenkurkun rannikolla: Mallilajeina ahven ja hauki. Luonnonvara- ja biotalouden tutkimus 57/2019. Luonnonvarakeskus. <https://jukuri.luke.fi/bitstream/handle/10024/544633/luke-luobio_57_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [Luettu 29.9.2021]
- Jerde, C., Chadderton, W., Mahon, A., Renshaw, M., Corush, J., Budny, M., Mysorekar, S., & Lodge, D. (2013). Detection of Asian carp DNA as part of a Great Lakes basin-wide surveillance program. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70, 522–526.
- Jerde, C., Mahon, A., Chadderton, W., & Lodge, D. (2011). “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 4, 150–157.
- Karlsson, E., Ogonowski, M., Sundblad, G., Sundin, J., Svensson, O., Nousiainen, I., & Vasemägi, A. (2022). Strong positive relationships between eDNA concentrations and biomass in juvenile and adult pike (*Esox lucius*) under controlled conditions: Implications for monitoring. *Environmental DNA*, 4, 881–893.
- Kelly, R., Port, J., Yamahara, K., & Crowder, L. (2014). Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PLoS ONE*, 9.
- Kuningas, S., Lappalainen, A., Veneranta, L., & Westerbom, M. (2021). Rannikon kalataloudellisilla kunnostuksilla tuetaan kalojen lisääntymismahdollisuuksia. Luonnonvarakeskus. <file:///C:/Users/35840/Downloads/Rannikon_kalataloudelliset_kunnostukset_Sanna_Kuningas.pdf> [Luettu 13.4.2022]
- Kuningas, S., Veneranta, L., Ojanen, H., Kallasvuo, M., & Lappalainen, A. (2019). Ihmistoiminnan vaikutukset rannikon kalojen lisääntymisalueisiin ja mahdollisuudet kunnostuksiin. Luonnonvara- ja biotalouden tutkimus. Luonnonvarakeskus, 27, 60.

- Lacoursière-Roussel, A., Rosabal, M., & Bernatchez, L. (2016). Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: variability among capture methods and environmental conditions. *Molecular Ecology Resources*, 16, 1401–1414.
- Lance, R., & Guan, X. (2020). Variation in inhibitor effects on qPCR assays and implications for eDNA surveys. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 77, 23–33.
- Lappalainen A., Veneranta L., Kuningas S., Olin M., & Aronsuu K. (2021). Rannikkolajien säätelyn tehostamismahdollisuudet ja -tarpeet Suomen rannikolla. Luonnonvara- ja biotalouden tutkimus 13/2021. Luonnonvarakeskus. <https://ju-kuri.luke.fi/bitstream/handle/10024/547228/luke-luobio_13_2021.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [Luettu 27.9.2021]
- Ljunggren, L., Sandström, A., Bergström, U., Mattila, J., Lappalainen, A., Johansson, G., Sundblad, G., Casini, M., Kaljuste, O., & Eriksson, B.K. (2010). Recruitment failure of coastal predatory fish in the Baltic Sea coincident with an offshore ecosystem regime shift. – *ICES Journal of Marine Science*, 67, 1587–1595.
- Loeza-Quintana, T., Abbott, C., Heath, D., Bernatchez, L., & Hanner, R. (2020). Pathway to Increase Standards and Competency of eDNA Surveys (PISCeS) - Advancing collaboration and standardization efforts in the field of eDNA. *Environmental DNA*, 2, 255–260.
- Luonnonvarakeskus. (2016). Kalatalouden ympäristöohjelma. <<https://www.luke.fi/projektit/kalatalouden-ymparistooohjelma/>> [Luettu 28.9.2021]
- Luonnonvarakeskus. (2016). Rannikon kutu ja poikasalueiden kunnostus. <<https://www.luke.fi/projektit/rannikon-kutu-ja-poikasalueiden-kunnost/>> [Luettu 28.9.2021]
- Maanmittauslaitos. Paikkatieto. 2022. <https://kartta.paikkatietoikkuna.fi/?lang=fi#> [Luettu 2.10.2022]
- Mahon, A., Jerde, C., Galaska, M., Bergner, J., Chadderton, W., Lodge, D., Hunter, M., & Nico, L. (2013). Validation of eDNA Surveillance Sensitivity for Detection of Asian Carps in Controlled and Field Experiments. *PLoS ONE*, 8.
- Maruyama, A., Nakamura, K., Yamanaka, H., Kondoh, M., & Minamoto, T. (2014). The Release Rate of Environmental DNA from Juvenile and Adult Fish. *PLoS ONE*, 9.
- Minamoto, T., Yamanaka, H., Takahara, T., Honjo, M. N., & Kawabata, Z. (2012). Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, 13, 193–197.

- Miya, M. (2022). Environmental DNA Metabarcoding: A Novel Method for Biodiversity Monitoring of Marine Fish Communities. *Annual Review of Marine Science*, 14, 161–185.
- Pawlowski, J., Apothéloz-Perret-Gentil, L., & Altermatt, F. (2020). Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology*, 29, 4258–4264.
- Pawlowski, J., Bonin, A., Boyer, F., Cordier, T., & Taberlet, P. (2021). Environmental DNA for biomonitoring. *Molecular Ecology*, 30, 2931–2936.
- Piaggio, A., Engeman, R., Hopken, M., Humphrey, J., Keacher, K., Bruce, W., & Avery, M. (2014). Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 14, 374–380.
- Pilliod, D., Goldberg, C., Arkle, R., & Waits, L. (2013). Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70, 1123–1130.
- Qiagen. (2021). Digital PCR: dPCR for beginners. <<https://www.qiagen.com/us/applications/digital-pcr/beginners>> [Luettu 6.10.2021]
- Quan, P., Sauzade, M., & Brouzes, E. (2018). dPCR: A Technology Review. *Sensors*, 18, 1271.
- Rees, H., Maddison, B., Middleditch, D., Patmore, J., & Gough, K. (2014). REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51, 1450–1459.
- Sandström O., Abrahamsson I., Andersson J. & Vetemaa M. 1997. Temperature effects on spawning and egg development in Eurasian perch. *Journal of Fish Biology*, 51, 1015–1024.
- Sansom, B., & Sassoubre, L. (2022). Correction to “Environmental DNA (eDNA) Shedding and Decay Rates to Model Freshwater Mussel eDNA Transport in a River”. *Environmental Science & Technology*, 56, 11907–11907.
- Schenekar, T. (2023). The current state of eDNA research in freshwater ecosystems: are we shifting from the developmental phase to standard application in biomonitoring? *Hydrobiologia*, 850, 1263–1282.
- Scheinin M., & Mattila J. (2010). The structure and dynamics of zooplankton communities in shallow bays in the northern Baltic Sea during a single growing season. *Boreal Environment Research*, 15, 397–412.

- Smith-Root. (2022). eDNA sampler. <<https://www.smith-root.com/edna/edna-sampler>> [Luettu 6.12.2021]
- Smith-Root. (2022). eDNA Sampler self-preserving filter packet. <<https://store.smith-root.com/collections/edna-filter-packs/products/edna-self-preserving-filter-pack?variant=40784761061547>> [Luettu 6.12.2021]
- Snickars, M., Sundblad, G., Sandström, A., Ljunggren, L., Bergström, U., Johansson, G., & Mattila, J. (2010). Habitat selectivity of substrate-spawning fish: modelling requirements for the Eurasian perch *Perca fluviatilis*. *Marine Ecology Progress Series*, 398, 235–243.
- Strand, D., Johnsen, S., Rusch, J., Agersnap, S., Larsen, W., Knudsen, S., Møller, P., & Vrålstad, T. (2019). Monitoring a Norwegian freshwater crayfish tragedy: eDNA snapshots of invasion, infection and extinction. *Journal of Applied Ecology*, 56, 1661–1673.
- Strickler, K., Fremier, A., & Goldberg, C. (2015). Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 183, 85–92.
- Suomen ympäristökeskus SYKE. (2019). Uhanalaistumisen syyt ja uhkatekijät. <https://www.ymparisto.fi/fi-fi/luonto/luontotyypit/luontotyypien_uhanalaisuus/Itameri/Uhanalaistumisen_syyt_ja_uhkatekijat> [Luettu 29.4.2022]
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., & Kawabata, Z. (2012). Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. *PLoS ONE*, 7.
- Thomsen, P., Kielgast, J., Iversen, L., Møller, P., Rasmussen, M., & Willerslev, E. (2012). Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. *PLoS ONE*, 7.
- Urho, L., Hildén, M., & Hudd, R. (1990). Fish reproduction and the impact of acidification in the Kyrönjoki River estuary in the Baltic Sea. *Environmental Biology of Fishes*, 27, 273–283.
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J., & Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25, 929–942.
- Veikkolainen, V., Vesterinen, E. J., Lilley, T. M. & Pulliainen, A. T. (2014). Bats as reservoir hosts of human bacterial pathogen, *Bartonella mayotimonensis*. *Emerging Infectious Diseases* 20, 960–967.

- Veneranta, L. (2021). Uusia menetelmiä rannikon kalojen lisääntymisaluekunnostusten arviointiin. Luonnonvarakeskus. Euroopan meri- ja kalatalousrahasto. <https://merikalatalous.fi/wp-content/uploads/Rannikkokunnostukset_Veneranta.pdf> [Luettu 27.9.2021]
- Whale, A., Huggett, J., & Tzonev, S. (2016). Fundamentals of multiplexing with digital PCR. *Biomolecular Detection and Quantification*, 10, 15–23.
- Wikström, J. (2004). POHJOISEN RANNIKKO-POHJANMAAN KALATALOUSALUEEN KÄYTTÖ- JA HOITOSUUNNITELMA. Ely-keskus. <https://www.ely-keskus.fi/documents/10191/44912086/Slutlig+Nyttjande+och+v%C3%A5rdplanen_NK%C3%96F_fin+2.pdf/997870d3-c6b4-97c5-c408-b1a381387fa8?t=1645187470043> [Luettu 5.10.2022]
- Wilcox, T., McKelvey, K., Young, M., Jane, S., Lowe, W., Whiteley, A., & Schwartz, M. (2013). Robust Detection of Rare Species Using Environmental DNA: The Importance of Primer Specificity. *PLoS ONE*, 8.
- Wistbacka, R. (2014). Rannikon pienvesien inventointiopas Inventoijan käsikirja. <<https://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/133809/Rannikon%20pienvesien%20inventointiopas.pdf?sequence=2&isAllowed=y>> [Luettu 8.10.2011]
- Wood, S., Pochon, X., Laroche, O., Ammon, U., Adamson, J., & Zaiko, A. (2019). A comparison of droplet digital polymerase chain reaction (PCR), quantitative PCR and metabarcoding for species-specific detection in environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 19, 1407–1419.

Liitteet

Liite 1. DNA-eristyksen 99-näytettä. Näytenumero, suodatuspaikka (pienvesistö), suodatuksen ajankohta päivämääränä ja suodatetun veden tilavuus litroina.

Näytenro	Paikka	Pvm	Tilavuus l	Näytenro	Paikka	Pvm	Tilavuus l
#13	Roliggropen	18.3.2021	0,49	Tv1	Ytteröfladan	16.3.2021	3,04
#15	Backfladan	24.3.2021	3,11	Tv2	Ytteröfladan	16.3.2021	2,95
#16	Backfladan	24.3.2021	3,08	Tv3	Ytteröfladan	16.3.2021	2,94
#17	Backfladan	24.3.2021	3,05	Tv4	Sommaröträsket	16.3.2021	2,96
#18	Backfladan	24.3.2021	3,03	Tv5	Sommaröträsket	16.3.2021	2,93
#21	Backfladan/kont	19.4.2021	3,15	Tv6	Sommaröträsket	16.3.2021	3,02
#22	Backfladan/kont	19.4.2021	3,05	Tv7	Solbackfladan	16.3.2021	3,04
#23	Backfladan	19.4.2021	1,06	Tv8	Solbackfladan	16.3.2021	2,95
#24	Backfladan	19.4.2021	1,03	Tv9	Solbackfladan	16.3.2021	2,95
#25	Backfladan	19.4.2021	1,03	Tv10	Ytteröfladan/kont	19.4.2021	3,01
#27	Roliggropen/kont	19.4.2021	3,08	Tv11	Ytteröfladan	19.4.2021	2,86
#28	Roliggropen	19.4.2021	0,70	Tv12	Ytteröfladan	19.4.2021	2,91
#29	Roliggropen	19.4.2021	0,73	Tv13	Ytteröfladan	19.4.2021	2,92
#30	Roliggropen	19.4.2021	0,80	Tv14	Sommaröträsket	19.4.2021	2,98
#33	Roliggropen/kont	3.5.2021	3,43	Tv15	Sommaröträsket	19.4.2021	2,95
#34	Roliggropen	3.5.2021	0,75	Tv16	Sommaröträsket	19.4.2021	2,96
#35	Roliggropen	3.5.2021	0,79	Tv17	Solbackfladan	19.4.2021	2,97
#36	Roliggropen	3.5.2021	0,70	Tv18	Solbackfladan	19.4.2021	2,96
#37	Roliggropen	3.5.2021	0,60	Tv19	Solbackfladan	19.4.2021	2,96
#38	Backfladan/kont	4.5.2021	3,10	Tv20	Ytteröfladan/kont	11.5.2021	3,03
#39	Backfladan a	4.5.2021	0,95	Tv21	Ytteröfladan	11.5.2021	1,39
#40	Backfladan a	4.5.2021	0,96	Tv22	Ytteröfladan	11.5.2021	1,6
#41	Backfladan a	4.5.2021	0,92	Tv23	Ytteröfladan	11.5.2021	1,51
#42	Backfladan b	4.5.2021	1,28	Tv24	Sommaröträsket	11.5.2021	2,98
#43	Backfladan b	4.5.2021	1,39	Tv25	Sommaröträsket	11.5.2021	2,93
#44	Backfladan b	4.5.2021	1,33	Tv26	Sommaröträsket	11.5.2021	2,89
#46	Roliggropen/kont	20.5.2021	3,13	Tv27	Solbackfladan	11.5.2021	1,77
#47	Roliggropen	20.5.2021	0,64	Tv28	Solbackfladan	11.5.2021	1,82
#48	Roliggropen	20.5.2021	0,60	Tv29	Solbackfladan	11.5.2021	2,08
#49	Roliggropen	20.5.2021	0,65	Tv30	Ytteröfladan/kont	18.6.2021	3,03
#51	Backfladan/kont	21.5.2021	3,07	Tv31	Ytteröfladan	18.6.2021	2,33
#52	Backfladan	21.5.2021	0,82	Tv32	Ytteröfladan	18.6.2021	2,47
#53	Backfladan	21.5.2021	0,92	Tv33	Ytteröfladan	18.6.2021	2,46
#54	Backfladan	21.5.2021	0,90	Tv34	Sommaröträsket	18.6.2021	1,14
#221	Backfladan/kont	16.6.2021	3,00	Tv35	Sommaröträsket	18.6.2021	1,26
#222	Backfladan	16.6.2021	0,87	Tv36	Sommaröträsket	18.6.2021	1,5
#223	Backfladan	16.6.2021	0,95	Tv37	Solbackfladan	18.6.2021	2,95
#224	Backfladan	16.6.2021	0,92	Tv38	Solbackfladan	18.6.2021	2,6
#225	Roliggropen/kont	16.6.2021	3,07	Tv39	Solbackfladan	18.6.2021	1,98
#226	Roliggropen	16.6.2021	2,20	Tv40	Ytteröfladan/kont	15.9.2021	3,23
#227	Roliggropen	16.6.2021	2,32	Tv41	Ytteröfladan	15.9.2021	1,83
#228	Roliggropen	16.6.2021	2,10	Tv42	Ytteröfladan	15.9.2021	2,09
#355	Roliggropen/kont	12.10.2021	3,11	Tv43	Ytteröfladan	15.9.2021	??
#356	Roliggropen	12.10.2021	3,00	Tv44	Sommaröträsket	15.9.2021	2,16
#357	Roliggropen	12.10.2021	?	Tv45	Sommaröträsket	15.9.2021	2,17
#358	Roliggropen	12.10.2021	2,90	Tv46	Sommaröträsket	15.9.2021	2,11
#359	Backfladan/kont	13.10.2021	3,04	Tv47	Solbackfladan	15.9.2021	3,02
#360	Backfladan	13.10.2021	0,88	Tv48	Solbackfladan	15.9.2021	3
#361	Backfladan	13.10.2021	0,89	Tv49	Solbackfladan	15.9.2021	3,02
#362	Backfladan	13.10.2021	0,93				

Liite 2. Taulukko kalalajeista, joita käytetty PCR-analyysiajon positiiviseen ja negatiiviseen kontrolliin, mix+ ja mix-.

Nro	Nimi suomeksi	Tieteellinen nimi
1	Lohi	<i>Salmo salar</i>
2	Kuha	<i>Sander lucioperca</i>
3	Harjus	<i>Thymallus thymallus</i>
4	Kiiski	<i>Gymnocephalus cernua</i>
5	Toutain	<i>Aspius aspius</i>
6	Lahna	<i>Abramis brama</i>
7	Kilohaili	<i>Sprattus sprattus</i>
8	Silakka	<i>Clupea harengus membras</i>
9	Pasuri	<i>Blicca bjoerkna</i>
10	Suutari	<i>Tinca tinca</i>
11	Imukala	<i>Liparis liparis</i>
12	Kolmipiikki	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
13	Ahven	<i>Perca fluviatilis</i>
14	Arapaima	<i>Arapaima giga</i>
15	Hauki	<i>Esox lucius</i>
16	Taimen	<i>Salmo trutta</i>
17	Kirjolohi	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
18	Muikku	<i>Coregonus albula</i>
19	Nelma	<i>Stenodus leucichthys</i>
20	Siika	<i>Coregonus lavaretus</i>
21	Kuore	<i>Osmerus eperlanus</i>
22	Puronieriä	<i>Salvelinus fontinalis</i>
23	Mustatäplätokko	<i>Neogobius melanostomus</i>
24	Särki	<i>Rutilus rutilus</i>
25	Järvilohi	<i>Salmo salar m. sebago</i>
26	Made	<i>Lota lota</i>
27	Vimpa	<i>Vimba vimba</i>
28	Turpa	<i>Squalius cephalus/Leuciscus cephalus</i>
29	Säyne	<i>Leuciscus idus</i>
30	Salakka	<i>Alburnus alburnus</i>
31	Miekkasärki	<i>Pelecus cultratus</i>
32	Sorva	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>
33	Härkäsimppu	<i>Myoxocephalus quadricornis</i>
34	Kampela	<i>Platichthys flesus</i>
35	Rasvakala	<i>Cyclopterus lumpus</i>
36	Kymmenpiikki	<i>Pungitius pungitius</i>
37	Kinivilkka	<i>Zoarces viviparus</i>
38	Isotuulenkala	<i>Hyperoplus lanceolatus</i>
39	Härkäsimppu	<i>Myoxocephalus quadricornis/Trigloopsis quadricornis</i>
40	Nahkiainen	<i>Lampetra fluviatilis</i>
41	Siloneula	<i>Nerophis ophidion</i>
42	Isosimppu	<i>Myoxocephalus scorpius</i>
43	Piikkikamplea	<i>Scophthalmus maximus</i>
44	Turska	<i>Gadus morhua</i>
45	Ankerias	<i>Anguilla anguilla</i>

