



www.emu.ee

Eesti Maaülikool

Estonian University of Life Sciences

Veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut
Institute of Veterinary Medicine and Animal Sciences

EMÜ VETERINAARMEDITSIINI JA LOOMAKASVATUSE INSTITUUT
Vesiviljeluse õppetool

Keskkonnaministeeriumi töövõtulepingu 4-1/20/81

2020. aasta aruanne

KALADE TAASTOOTMISE ALASED GENEETIKAUURINGUD 2020. AASTAL

Vastutav täitja Riho Gross

Tartu, 2021

Sisukord

Lepingu lähteülesanne 2020	3
Sissejuhatus	4
Kasutatud mõisted	5
1. RMK Põlula kalakasvanduses peetava Kunda jõe päritolu lõhe sugu- ja asenduskarja geneetiline mitmekesisus	7
1.1. <i>Kunda jõe päritolu lõhe sugukarja ja asenduskarja geneetiline mitmekesisus.....</i>	<i>7</i>
1.2. <i>Soovitused geenipankade edaspidiseks arendamiseks</i>	<i>10</i>
2. RMK Põlula kalakasvatustalituse Kunda lõhekarja genofondi täiendamiseks 2020.a. loodusest püütud sugukalade ja kääbusisaste geneetilise mitmekesisuse ja kvaliteedi analüüs	14
3. Pärnu jõe lõhepopulatsiooni taastamise eesmärgil 2020. aastal Pärnu jõest püütud lõhe sugukalade geneetilised iseärasused	16
4. Pärnu jõest 2020.a. püütud hõredapiilise siirdesiia sugukalade geneetilised iseärasused	19
5. Peipsi järvest 2020. a. püütud siia sugukalade geneetilised iseärasused	22
Kokkuvõte	24
Lisa 1. Kunda lõhe asenduskarja 2020. a. kiibistatud 3+ kalade geneetilise puhtuse ja genotüübilise soo määramise tulemused.....	28

Lepingu lähteülesanne 2020

„Kalade taastootmise alased uuringud 2020. aastal“

Tööde kirjeldus

- 3.1. RMK Põlula Kalakasvanduses (edaspidi PKK) peetavate Kunda ja Pärnu/Daugava jõgede päritolu lõhe ja Pärnu hõredapiilise siia asenduskarjade põhjal:
 - 3.1.1 analüüsitakse Kunda jõe päritolu lõhe asenduskarjas 17 DNA mikrosatelliitmarkeriga ca 100 lõhe proovi ja teostatakse neile soo määramine Y-kromosoomi spetsiifilise markeri alusel;
 - 3.1.2 analüüsitakse Daugava päritolu lõhe asenduskarjas 17 DNA mikrosatelliitmarkeriga ca 350 lõhe proovi ja teostatakse nende täis- ja poolõveperekondadesse määramine;
 - 3.1.3 analüüsitakse Pärnu poolsiirdesiia asenduskarjas 12 DNA mikrosatelliitmarkeriga ca 50 siia proovi;
 - 3.1.4 esitatakse konkreetsete soovitusel geenipankade edaspidiseks arendamiseks ja lõhe puhul soovitusel Kunda päritolu karja suuruse vähendamiseks. Tehakse ettepanekud geneetiliselt mittesobivate (nt triploidsete kalade) ja lähisuguluses isendite sugu- ja asenduskarjast väljaprakeerimiseks ja kalade ristamisskeemi koostamiseks.
- 3.2. Analüüsitakse 17 DNA mikrosatelliitmarkeri osas PKK Kunda päritolu lõhe sugukarja ca 80 isase niisa sobivust krüogeenipanka ja antakse hinnang nende geneetilisele mitmekesisusele ja kvaliteedile (liigiline puhtus ja triploidsete kalade esinemine/puudumine).
- 3.3. Analüüsitakse PKK Kunda päritolu lõhe sugukarja geneetilise mitmekesisuse eesmärgil 2020. aastal Kunda jõest püütavaid sugukalaid 17 DNA mikrosatelliitmarkeri osas (kuni 80 proovi). Analüüsiks vajaliku kala püügid korraldab PKK.
- 3.4. Analüüsitakse PKK harjuse karja geneetilise mitmekesisuse eesmärgil 2020. aastal loodusest (Kunda jõest või mujalt) püütavaid harjuse sugukalaid (kokku ca 50 proovi) 12 DNA mikrosatelliitmarkeriga. Analüüsiks vajaliku kala püügid korraldab PKK.
- 3.5. Analüüsitakse PKK Pärnu päritolu lõhe sugukarja geneetilise mitmekesisuse eesmärgil 2020. aastal Pärnu jõest püütavaid lõhe sugukalaid 17 DNA mikrosatelliitmarkeri põhjal (kuni 30 proovi). Analüüsiks vajaliku kala püügid korraldab PKK.
- 3.6. Analüüsitakse Pärnu jõest püütavate hõredapiilise siirdesiia sugukalade (ca 50 proovi) geneetilise iseärasuse 12 DNA mikrosatelliitmarkeri põhjal. Analüüsiks vajaliku kala püügid korraldab PKK.
- 3.7. Analüüsitakse Peipsi järvest ja/või Hiiumaa rannavetest püütavate siia sugukalade (kokku ca 100 proovi) geneetilise iseärasuse 12 DNA mikrosatelliitmarkeri põhjal. Analüüsiks vajaliku kala püügid korraldab PKK.
- 3.8. Antakse Keskkonnaministeeriumile konsultatsioone riikliku taastootmise tegevuskava alusel kasvandustes loodavate kalade sugukarjade geneetilise päritolu ja mitmekesisuse aspektist lähtuvalt.

Sissejuhatus

2020. aasta aruanne on osa 1995. aastal alanud pikaajalisest EMÜ VLI vesiviljeluse õppetooli koostööst Keskkonnaministeeriumi ja RMK Põlula kalakasvatustalitusega (varem Põlula Kalakasvatusekeskus ja RMK Põlula kalakasvatuseosakond), mille eesmärgiks on kalade taastootmise alaste uuringute teostamine vastavalt lepingus püstitatud lähteülesandele (vt. lk. 3).

Lepingu raames saime 2020. a. RMK Põlula kalakasvandusest (edapidi PKK) geneetiliseks analüüsiks kokku 541 kala koeproovid, s.h. 47 Kunda lõhe sugukarja asenduskala, 84 Kunda jõest püütud lõhe sugukala ja kääbusisast, 19 Pärnu jõest püütud lõhe sugukala, 104 Pärnu jõest püütud siirdesiia sugukala ja 287 Peipsi järvest püütud siia sugukala.

Lähteülesande punkte 3.1.2 ja 3.1.3 ei olnud võimalik täita, kuna PKK ei kiibistanud 2020. aastal Daugava päritolu lõhe asenduskarja ja Pärnu poolsiirdesiia asenduskarja kalu ega kogunud neilt proove geneetiliseks analüüsiks. Samuti ei olnud võimalik täita punkti 3.2., kuna PKK ei kogunud 2020. aastal Kunda päritolu lõhe sugukarja isastelt sügavkülmutamiseks niiska. Täita ei olnud võimalik ka punkti 3.4, kuna PKK ei püüdnud 2020.a. loodusest harjuse sugukalasad.

Lepingu aruande koostas EMÜ vesiviljeluse õppetooli juht, professor Riho Gross. Laboratoorsed geneetilised analüüsid teostasid EMÜ vesiviljeluse õppetooli töötajad Oksana Burimski ja Kerli Haugjärv. Andmeanalüüsi teostasid Riho Gross ja EMÜ vesiviljeluse õppetooli vanemteadur Anti Vasemägi. Lepingu täitjad tänavad Kunnar Klaasi ja Ene Saadret RMK Põlula kalakasvatustalitusest ning Martin Keslerit ja Heli Špilevit TÜ Eesti Mereinstituudist abi eest koeproovide kogumisel.

Kasutatud mõisted

Populatsioon ehk asurkond - ühte liiki kuuluvate isendite kogum, mida ühendab ühine päritolu ning sarnane genofond ja mis on naaberpopulatsioonist suhteliselt isoleeritud geograafiliste barjääride või käitumuslike iseärasuste jt. ristumisbarjääri tekitavate tegurite kaudu. Populatsiooni olulisteks tunnusteks on ajaline püsivus ja isendite vaba ristumine (random mating) ehk panmiksia, mis tagab sama populatsiooni isendite sarnasuse.

Geneetiline marker - geen või mingi muu DNA fragment, millel on kergesti identifitseeritav fenotüüp ja mille pärandumist on võimalik kindlaks teha.

Mikrosatelliitse DNA markerid ehk mikrosatelliidid - DNA järjestused, mis koosnevad tandeemselt korduvatest ühe kuni kuue nukleotiidi pikkustest motiividest. Tandeemsete korduste arv on seejuures väga varieeruv, moodustades erineva pikkusega (aluspaaride arvuga) allele. Olenevalt korduste struktuurist võib mikrosatelliite jagada: mono-, di-, tri-, tetranukleotiidseteks jne.

Lookus - mingil viisil (hrl. alleelse muutlikkuse järgi) iseloomustatav (identifitseeritav) kromosoomi või DNA-molekuli lõik, milles paikneb kindel geen (geenilookus) või mis tahes muu eristatav nukleotiidjärjestus (geneetilise markeri lookus).

Alleel - geeniteisend, geeni esinemisvorm; üks kahest või mitmest alternatiivsest geenivariandist, mis erinevad nukleotiidide järjestuse ja sageli ka funktsiooni poolest; laiemas tähenduses: mis tahes genoomse lookuse (näit. geneetilise markeri) alternatiivne vorm, mida iseloomustab unikaalne nukleotiidne järjestus. **Alleelide keskmine arv markerlookuses (A)** ja selle valimi suurusele korrigeeritud väärtus, **alleelirohkus (A_r)**, on üks näitaja, mis iseloomustab populatsiooni geneetilist muutlikkust (vt. ka heterosügootsus).

Genotüüp - indiviidi geneetiliste lookuste alleelne koosseis; diploidsetel organismidel eristatakse iga geeni suhtes **homosügootset genotüüpi** (indiviid pärib mõlemalt vanemalt sama geenivariandi või geneetilise markeri nukleotiidse järjestuse ehk alleeli, nt AA või BB) ja **heterosügootset genotüüpi** (indiviid pärib kummaltki vanemalt erineva alleeli, nt AB).

Heterosügootsus (H) - heterosügootsete isendite proportsioon populatsioonis. Kasutatakse populatsiooni geneetilise muutlikkuse hindamisel. Heterosügootsuse all mõistetakse ka indiviidi genotüübi seisundit, kus homologiliste kromosoomide samas lookuses (või mitmes vaatlusaluses lookuses) asuvad ühe geeni erinevad alleelid. **Oodatav heterosügootsus (H_e)** – arvutatakse markerlookuste alleelisageduste põhjal ja näitab tõenäosust, et indiviid on heterosügootne uuritava(te)s lookus(t)es. **Tegelik heterosügootsus (H_o)** - uuritava(te)s

lookus(t)es heterosügootse genotüübiga isendite tegelik (vaadeldud) proportsioon populatsioonis.

Inbriiding ehk suguluspaaritus - populatsiooni keskmisest lähemas suguluses isendite paaritamine. Inbriiding suurendab populatsiooni keskmist homosügootsust, st suurendab homosügootsete genotüüpide sagedust (ja vastavalt vähendab heterosügootsete genotüüpide sagedust), kuid ei muuda alleelide sagedust.

Inbriidingukoefitsient (F) - vanemate geneetilisest sugulusest tingitud homosügootsuse suurenemise tõenäosus järglastel võrreldes lähtepopulatsiooniga. Kui iseviljastamisel on F väärtus 0,5, siis vanema ja järglase või õe ja venna paaritamisel 0,25 ning poolõe ja -venna paaritamisel 0,125. Geneetilisi markereid kasutades hinnatakse inbriidingukoefitsienti Wrighti F -statistiku F_{IS} abil, mis leitakse populatsiooni oodatava ja tegeliku heterosügootsuse vahe suhtena oodatavasse heterosügootsusesse ning mille väärtus võib olla vahemikus -1 kuni 1. F_{IS} negatiivne väärtus näitab autbriidingut, positiivne väärtus näitab inbriidingut ja $F_{IS}=0$ näitab isendite juhuslikku paarumist ja genotüübisageduste vastavust Hardy-Weinbergi tasakaaluseadusele. Ohustatud kalaliikide taastootmisel peaks eesmärk olema hoida summarne $F_{IS} \leq 0.05$ ja F_{IS} lubatav väärtus põlvkonna kohta sõltub taastootmisprogrammi planeeritud ajalisest kestusest ehk põlvkondade koguarvust taastootmisprogrammis (näit. kui taastootmisprogrammi kestuseks on planeeritud 10 põlvkonda, siis F_{IS} lubatav väärtus ühe põlvkonna kohta on kuni 0.005).

Fikseerumisindeks F_{ST} – populatsioonide geneetilise diferentseerituse näitaja, mis iseloomustab populatsioonide või aastaklasside vahelistest erinevustest tingitud geneetilise variatsiooni proportsiooni kogu geneetilises variatsioonis. F_{ST} leitakse geneetiliste markerite (näit. mikrosatelliitide) lookuste alleelisageduste dispersiooni põhjal ja selle väärtused võivad olla vahemikus 0 kuni 1, kusjuures väärtus 0 näitab isendite täielikku vaba paarumist ehk panmiksiat (diferentseerumine puudub) ja väärtus 1 näitab kahe populatsiooni isendite täielikku isoleeritust ja ühise geneetilise diversiteedi puudumist (täielik diferentseerumine). Tegelikult sõltub F_{ST} indeksi võimalik maksimaalne väärtus selle hindamiseks kasutatud geneetilise markeri polümorfisusest ehk võimalike erinevate alleelide koguarvust lookuses ja kõrge polümorfisusega markeritel (näit. mikrosatelliitidel) on see alati madalam kui 1. Vastavalt F_{ST} indeksi väärtusele on populatsioonide diferentseerituse taset interpreteeritud ka kategooriatena, näit. Hartl & Clark (1997) järgi:

- < 0.05 = vähene/madal geneetiline diferentseeritus
- 0.05 - 0.15 = mõõdukas geneetiline diferentseeritus
- 0.15 - 0.25 = tugev geneetiline diferentseeritus
- > 0.25 = väga tugev geneetiline diferentseeritus.

1. RMK Põlula kalakasvanduses peetava Kunda jõe päritolu lõhe sugu- ja asenduskarja geneetiline mitmekesisus

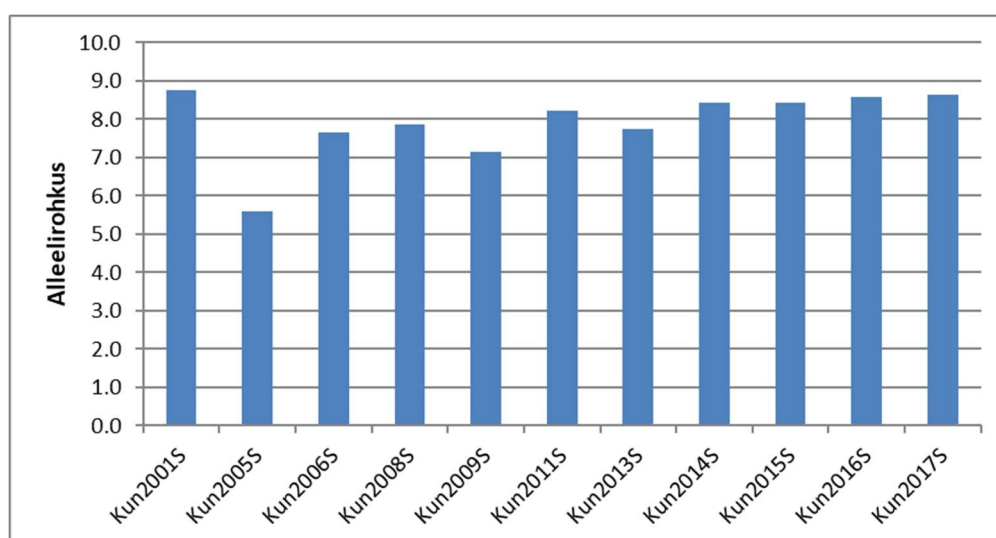
1.1. Kunda jõe päritolu lõhe sugukarja ja asenduskarja geneetiline mitmekesisus

Kunda lõhe sugukarja ja asenduskarja (samuti ka peatükkides 2 ja 3 analüüsitud lõhede) genofondi seireks kasutasime 17-st mikrosatelliidilookusest koosnevat DNA markerite paneeli, mida kasutavad ka Soome Looduslike ressursside instituudi (LUKE) uurijad. Mikrosatelliitmarkerite laboratoorse analüüsi metoodika on täpsemalt kirjeldatud artiklis Ozerov et al. (2016). Geneetilist muutlikkust iseloomustati kõigi uuritud markerilookuste keskmise tegeliku ja teoreetiliselt oodatava heterosügootsusena (vastavalt H_o ja H_e) ning markerilookustes esinevate erinevate DNA järjestuste ehk alleelide keskmise arvuna (A) ja selle valimi suurusele korrigeeritud väärtusena ehk alleelirohkusena (A_r). Sugu- ja asenduskarja aastaklasside geneetilist diferentseeritust hinnati indeksi F_{ST} põhjal. Lähisuguluspaaritustest (õde-vend, vanem-järglane jne.) tingitud inbriidingu taset iseloomustati inbriidingukoefitsiendi F_{IS} abil.

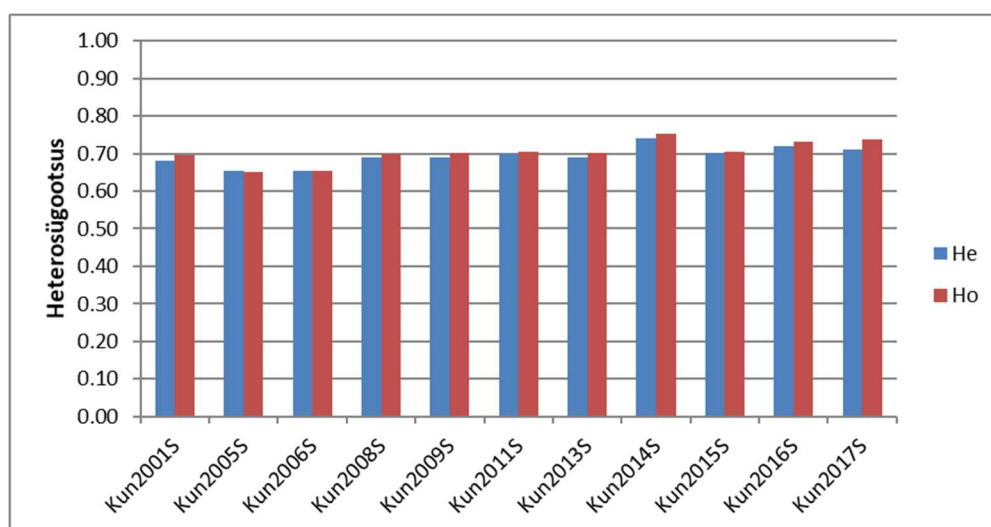
PKK-s peetava Kunda lõhe elusgeenipanga genofondi seisundit ja selle muutusi hindasime sugukarja 11 aastaklassi põhjal (tabel 1). Neist viimane on sugukarja 2017. aastaklassi asenduskarja (Kun2017S), mille 2020. a. sügisel kiibistatud 47 kala genotüpiseeriti käesoleva lepingu raames. **Nende hulgas esines ühel kalal (kiibi number 62D5) triploidsusele viitavaid genotüüpe ning see isend tuleks asenduskarjast praakida** (Lisa 1). Kokku analüüsisime 2775 Kunda geenipanga sugu- ja asenduskarja kala genotüübiandmeid. Sugukarja 0-põlvkonna (loodud 2001.-2002. a. Kunda jõest püütud noorkalade baasil) genofondi näitajaid käsitleme seejuures alusandmetena järgnevate põlvkondade ja aastaklasside genofondi võrdlevaks analüüsiks.

Kunda 0-põlvkonna (Kun2001S) sugukarja geneetiline muutlikkus oli veidi kõrgem kui Kunda 1996-1998. a. looduslikel valimitel. Geenipanga 0-põlvkonna sugukalade 2005. a. koorunud järglaste (Kun2005S, esimene aastaklass geenipanga I põlvkonnast) geneetiline muutlikkus oli aga võrreldes 0-põlvkonnaga järsult vähenenud (alleelirohkus A_r vastavalt 10.8 ja 6.1; tegelik heterosügootsus H_o vastavalt 0.70 ja 0.65; tabel 1 ja joonised 1 ja 2). Selline pilt on tüüpiline

populatsiooni suuruse nn. „pudelikaela“ puhul, kus ainult suhteliselt väike osa kogu populatsioonist osaleb järgmise põlvkonna moodustamises ja seetõttu ei kandu järglaskonnale üle ka kogu genofondi mitmekesisus ning sellega kaasnevad väiksema sagedusega esinevate alleelide kaotsimine, alleelisageduste juhuslikud muutused ehk nn. juhuslik geenitriiv ja inbriidingu suurenemise tõenäosus. Kalakasvandustes annab samasuguse tulemuse suhteliselt väikese arvu sugukalade kasutamine järglaskonna saamiseks ja ilmselgelt on see ka Kunda lõhe geenipanga I põlvkonna 2005. aastaklassi geneetilise vaesumise ja markerlookuste alleelisageduste märgatavate muutuste peamine põhjus, kuna 2005. aastaklassi tootmiseks kasutati ainult 8 emas- ja 8 isaskala.



Joonis 1. Kunda lõhe sugukarja aastaklasside alleelirohkus.



Joonis 2. Kunda lõhe sugukarja aastaklasside keskmine oodatav (H_e) ja tegelik (H_o) heterosüütootsus.

Tabel 1. RMK Põlula kalakasvatustalituses peetava Kunda lõhe sugu- ja asenduskarja geneetilist muutlikkust iseloomustavad näitajad (n – isendite arv, A – keskmine alleelide arv, A_r – alleelide rohkus, H_e ja H_o – oodatav ja tegelik keskmine heterosügootsus, F_{IS} - inbriidingukoefitsient).

Tähis*	Koorumis aasta	Põlv- kond	Vanemad*	n	A	A_r	H_e	H_o	F_{IS}
Kun2001S	2000-2002	0	looduslik lõhe	174	10.8	8.5	0.68	0.70	-0.022
Kun2005S	2005	I	Kun2001S (8Ex8I)	172	6.1	5.5	0.65	0.65	0.002
Kun2006S	2006	I	Kun2001S (47Ex35I)	234	9.7	7.4	0.65	0.65	-0.002
Kun2008S	2008	I	Kun2001S (59Ex44I)	262	9.1	7.7	0.69	0.70	-0.012
Kun2009S	2009	I, II	Kun2001S (19Ex13I); Kun2005S (56Ex43I)	308	8.1	7.0	0.69	0.70	-0.016
Kun2011S	2011	II	Kun05S(21E) x Kun06S(47I) , Kun06S(63E) x Kun05S(8I)/1KI	577	10.2	8.0	0.70	0.70	-0.009
Kun2013S	2013	II, III	Kun06S(49E) x Kun09S(49I), Kun06S(19E) x Kun08S(19I) , Kun08S(27E) x Kun09S(25I) , Kun08S(20E) x Kun06S(21I)	357	9.8	7.6	0.69	0.70	-0.016
Kun2014S	2014	II, III	Kun09S(56E) x Kun08S(47I) , Kun08S(47E) x Kun09S(47I) , Kun08S(25E) x Kun14KI(25I) , Kun13L(3E) x Kun13KI(18I)	319	9.9	8.3	0.74	0.75	-0.016
Kun2015S	2015	II, III	Kun08S(16E) x Kun14KI(18I), Kun08S(54E) x Kun09S(54I), Kun09S(66E) x Kun11S(58I), Kun14L(4E) x Kun14KI(18I)	150	9.3	8.3	0.70	0.70	-0.005
Kun2016S	2016	II, III	Kun09S(42E) x Kun15KI(45I), Kun09S(54E) x Kun12S(54I), Kun09S(5E) x Kun15LS(5I), Kun09S(3E) x Kun11S(3I), Kun11S(17E) x Kun12S(17I), Kun12S(6E) x Kun11S(6I). Kun15LS(5E) x Kun15LS(5I)	176	10.1	8.6	0.72	0.73	-0.019
Kun2017S	2017	II, III, IV	132 emast (Kun09S, Kun11S, Kun16LS) x 134 isast (Kun13S, Kun16LS, Kun16KI)	47	8.6	8.6	0.71	0.74	-0.040
Keskmine					9.2	7.9	0.69	0.70	-0.014

*S – sugukari; LS – Kunda jõest püütud sugukalad; KI - kääbusisased

Geenipanga järgmiste aastaklasside (2006., 2008., 2009., 2011., 2013., 2014., 2015., 2016. ja 2017. a. koorunud) järglaste saamiseks kasutati suuremat arvu sugukalu ja see peegeldub ka nende aastaklasside kõrgemas geneetilisest muutlikkuses võrreldes 2005. aastaklassi kaladega (tabel 1, joonised 1 ja 2). Kunda 2017. a. koorunud asenduskarja kalade alleelirohkus on sarnane 2011., 2014., 2015. ja 2016. a. koorunud aastakäikudega ning keskmine oodatav ja tegelik heterosügootsus on sarnane 2008-2016 aastaklassidega, mis näitab kasutatud

sugukalade suure arvu ja erinevate aastakäikude sugukalade paaritamise positiivset mõju (tabel 1, joonised 1 ja 2).

Lähisuguluspaaritustest (õde-vend, vanem-järglane jne.) tingitud inbriidingu taset iseloomustava inbriidingukoefitsiendi F_{IS} väärtused ei erine kõigis uuritud Kunda geenipanga aastaklassides statistiliselt oluliselt nullist (tabel 1), mis näitab, et lähisuguluspaaritused pole seni olnud probleemiks.

Kunda sugukarja erinevate aastaklasside üldine geneetiline diferentseeritus on madal ($F_{ST} = 0.016$), mis näitab, et alleelisageduste ajaline muutlikkus ei ole väga suur ja sellest tingitud variatsioon moodustab vaid 1.6% kogu geneetilisest variatsioonist. 2017. a. koorunud asenduskarja (Kun2017S) diferentseeritus 2008-2016 aastaklassidest on 0.006-0.017 ning 0-põlvkonnast (Kun2001S) 0.014, mis näitab, et Kun2017S aastaklass on DNA markerlookuste alleelisageduste poolest üsna sarnane 2001.-2002. a. Kunda jõest püütud noorkalade baasil loodud Kunda sugukarja 0-põlvkonnaga ja geenipanga 2008-2016 aastaklassidega.

Kunda 2017. a. koorunud asenduskarja 3+ kalade geneetilise sugupoole määramiseks kasutasime Y-kromosoomi spetsiifilise geneetilist markerit, mille abil on võimalik määrata asenduskarja kalade sugupoolt ka mittesuguküpsetel isenditel ning kontrollida fenotüübilise soo määramise korrektsust. Uuritud 46 kalast osutusid geneetiliselt isasteks kõik 46 isendit (Lisa 1). See on kooskõlas fenotüübilise soo määranguga (PKK andmed).

1.2. Soovitused geenipankade edaspidiseks arendamiseks

Geenipanga pidamise eesmärgiks on säilitada kohalikku loodusliku päritoluga genofondi ja kasutada seda ohustatud populatsioonide taastamiseks ja tugevdamiseks. Ohustatud kalaliikide taastootmisel tuleb vältida inbriidingu suurenemist ja säilitada geneetilise muutlikkuse taset (vältida haruldasmate alleelide kaotsi minekut) ning selle tagamiseks on vajalik paljundamisel kasutada piisavalt suurt arvu sugukalu. Paljundamiseks kasutatud sugukalade arv ja sugupoolte vahekord määravad nn. efektiivse populatsiooni suuruse (N_e). Selle vajaliku suuruse leidmiseks tuleb määratleda: (i) kui palju inbriidingut on taastootmise

programmi kestel aktsepteeritav, (ii) kui haruldased on alleelid, mida soovitakse säilitada ja millist karantiid nende säilitamiseks soovitakse ning (iii) põlvkondade arv taastootmise programmi kogu kestuse jooksul. Teaduskirjanduse andmeil soovitatakse ohustatud kalaliikide taastootmisel vältida inbriidingukoefitsiendi F suurenemist rohkem kui 0.01 võrra (mõned allikad aga soovitavad lubada F suurenemist maksimaalselt 0.05 võrra) kogu taastootmisprogrammi jooksul ja tagada haruldaste alleelide (mille sagedus on 0.01) säilimine tõenäosusega 99% (jällegi, on ka soovitusi, mille kohaselt tuleks tagada 0.05 sagedusega alleelide säilimine tõenäosusega 95%). Mida rangemad on eesmärgid, seda suurem N_e on vajalik, et neid eesmäärke täita. Näiteks kui soovime 5 põlvkonna jooksul tagada 0.01 sagedusega alleelide säilimise tõenäosusega 99%, siis on selleks vajalik igas põlvkonnas $N_e=309$, tõenäosuse 95% korral aga $N_e=229$. Kui aga soovime 5 põlvkonna jooksul tagada 0.05 sagedusega alleelide säilimise tõenäosusega 99%, siis on selleks vajalik N_e igas põlvkonnas 61, tõenäosuse 95% korral aga $N_e=45$. Eeltoodud N_e suurused tagavad järgmised inbriidingukoefitsiendi F lubatavad sihtväärtused 5 põlvkonna järel: $N_e=309$ korral $F=0.008$, $N_e=229$ korral $F=0.011$, $N_e=61$ korral $F=0.041$ ja $N_e=45$ korral $F=0.056$. Üldiselt on soovitav ohustatud kalaliikide taastootmisprogrammides kasutada $N_e=200-300$ ja aretusprogrammides $N_e=50-100$ sõltuvalt põlvkondade arvust programmis.

Populatsioonigeneetika teooria kohaselt on kõige otstarbekam ühe emaskala ristamine ühe isaskalaga. See tagab samasuguse sugukarja suuruse juures maksimaalse N_e . Tootmise efektiivsuse huvides võib ristata 1 emase 2-3 isasega, kuid sel juhul on samaväärse N_e saavutamiseks vaja pidada suuremat sugukarja. Näit. N_e võrdub ühtemoodi 200-ga kui paaritada 100 emast ja 100 isast (sugukarja suurus 200 kala) või 75 emast ja 150 isast (sugukarja suurus 225 kala). Kui on vaja moodustada sugukarja baasil asenduskari, siis on oluline tagada iga paari võrdne panus järglaskonda, et vältida mõnede vanemate üle- või alaesindatust järgmises põlvkonnas. Selleks oleks vaja perekondade (täisõed-vennad) marja eraldi hautada ja kasvatada suuruseni, kus tehakse valik sugukarja ning valida juhuslikult igast perekonnast võimalikult võrdne arv isendeid. Aga praktika on näidanud, et iga kala ei anna suguprodukte, seega 200 isendist koosneva sugukarja puhul ei ole alati võimalik 100 emaskala marja ja 100 isaskala niisa saamine. Seetõttu peaks sugukarjas pidama suuremat arvu emas- ja isaskalu kui minimaalne vajadus.

Inbriidingukoefitsiendi F suurenemist ja haruldaste alleelide kaotsimineku tõenäosust aitab vähendada ka perioodiline 'verevärskendus' loodusest püütud sugukalade abil. Inbriidingu suurenemist aitab vältida ka erinevate aastaklasside sugukalade omavaheline paaritamine, mis hoiab ära lähisuguluses (õde-vend) indiviidide paaritamise. Jätkuvalt tuleks geneetiliste meetodite abil hinnata nii loodusest püütud kui asenduskarja sugukalu liigilise puhtuse ja triploidide esinemise suhtes. Olukorras, kus lõhe asustamise vajadus Põhja-Eesti jõgedesse on vähenenud võib tekkida küsimus, kas see peaks väljenduma ka PKKs peetava Kunda lõhe sugukarja suuruses. **Tuleb rõhutada, et geneetilise mitmekesisuse säilitamiseks ja inbriidingu suurenemise ära hoidmiseks nii geenipanga sugukarjas kui nende järglastega asustatud populatsioonides ei tohi paljundamisel vähendada efektiivse populatsiooni suurust alla ülal toodud teaduslikult põhjendatud soovituslike väärtuste**, sest vastasel korral on negatiivsed muutused genofondis vältimatud. Sugukarja suuruse optimeerimiseks võiks geenipangas pidada ainult (või peamiselt) emaseid sugukalu (kasutades paljundamisel 50-100 isendit) ja nende marja viljastamiseks kasutada kas loodusest püütud isaskalade ja/või sügavkülmutatud geenipanga isaste spermat.

Geenipanga pidamisel tuleb vältida nn. kodustavat valikut, mis isegi tahtliku inimtegevuse (näit. suuremate kalade valik asendus- ja sugukarja) vältimise korral on kasvanduse tingimustes pidamisel mingil määral paratamatu. Vangistuses annavad kergemini järglasi need isendid, kes kohanevad paremini inimese manipuleerimise ja kunstliku paljundamise tingimustega. Neist järglastest jäävad omakorda ellu eeskätt need, kes taluvad paremini kasvanduse tingimusi. Samuti on kalakasvataval kasvõi alateadlik soov valida talle paremini sobivaid kalu (suuremaid, viljakamaid, kergemini marja andvaid, sobival ajal küpsevaid). Selle vältimiseks tuleb kalu asendus- ja sugukarja valida võimalikult juhuslikult. Pidevalt tuleks teha ka looduslike populatsioonide ja kasvanduse sugukarjade geneetilist monitooringut, et hinnata paljundamismetoodika mõju geneetilisele mitmekesisusele ja inbriidingu tasemele.

Geneetilise mitmekesisuse säilitamiseks ja taastamiseks, samuti ette planeeritud paaritamisskeemi kasutamiseks on võimalik kasutada ka isaskalade sügavkülmutatud spermapanka. See võimaldab ristata erinevate põlvkondade ja aastakäikude sugukalu ning valida paare lähisuguluspaaritamise vältimise eesmärgil. Samuti võimaldab sügavkülmutatud sperma kasutamine vähendada isaskalade arvu sugukarjas. Krüogeenipanga loomine ja

pidamine eeldab vastava infrastruktuuri olemasolu ja personali väljaõpet RMK Põlula kalakasvatustalituses, millega alustati 2016. aastal. Kunda lõhe asenduskarja 2016. aastal koorunud 3+ isaskalade spermat sügavkülmutati esmakordselt 2019. aastal, kasutades selleks Kehtna seemendusjaama laboratooriumi infrastruktuuri. Geograafilise kauguse tõttu oleks siiski otstarbekam vastav struktuur välja arendada kohapeal PKK-s.

Meie poolt esmakordselt 2019. a. rakendatud Y-kromosoomi spetsiifilise geneetilise markeri abil on võimalik määrata lõhe asenduskarja kalade sugupoolt ka mittesuguküpsetel isenditel, kelle fenotüübiline sugu pole visuaalselt määratav. See võimaldab optimeerida sugukarja sugulist vahekorda varasemalt kui seni ning säästa sellega sugukarja pidamiseks vajalikke ressursse.

Kuna Pärnu jõe lõhe- ja hõredapiilise siia populatsiooni taastootmisel on probleemiks olnud jõest kättesaadavate sugukalade väike arv (siia puhul eelkõige emaskalade väga väike arv), siis on tõsine oht, et väikese arvu sugukalade kasutamisega taastootmiseks kaasneb inbriidingukoefitsiendi oluline suurenemine ja haruldasemate alleelide väga kõrge tõenäosusega kaotsimine. Sellise oluliselt madalama geneetilise muutlikkuse ja kõrgendatud inbriidingukoefitsiendiga järglaskonna kalade asustamine mõjutab negatiivselt ka Pärnu jõe lõhe- ja siiapopulatsiooni genofondi ja tekitab kasu asemel pigem kahju. Kui Pärnu jõest ei õnnestu püüda piisavat arvu lõhe sugukalu, siis tuleks asustatavate noorkalade tootmiseks kindlasti täiendavalt kasutada suuremat arvu PKK Daugava sugukarja kalu. Enne lõhe ja siia noorkalade asustamist Pärnu jõkke oleks edaspidi soovitatav hinnata nende maimude või 0+ valimi põhjal asustatamisele minevate kalade kvaliteeti ja geneetilise muutlikkuse taset.

2. RMK Põlula kalakasvatustalituse Kunda lõhekarja genofondi täiendamiseks 2020.a. loodusest püütud sugukalade ja kääbusisaste geneetilise mitmekesisuse ja kvaliteedi analüüs

2020. a. sügisel saadi PKK-st Kunda jõest püütud 9 emassugukala, 11 isassugukala ja 64 varasuguküpse nn. "kääbusisase" koeproovid. Geneetilise puhtuse ja kvaliteedi analüüs näitas, et hübriidseid ja triploidseid isendeid uuritud kalade seas ei esinenud. Küll aga olid 7 kääbusisase koeproovid tugevalt kontamineeritud, s.t. nendelt eraldatud DNA amplifitseerimisel esines uuritud markerlookustes rohkem kui 2 alleeli ehk mitme isendi alleelide segu. See näitab, et koeproovide kogumisel kääbusisastelt (25.-26.11.2020) ei järgitud piisavalt töövahendite hoolika puhastamise nõuet. Nende 7 isendi genotüübid eemaldati andmeanalüüsist.

2020. a. püütud emas- ja isassugukalade alleelirohkus ($A_r = 7.6$) oli mõnevõrra kõrgem kui 2010-2019. a. Kunda jõe noorkalade valimitel ($A_r = 6.5-7.1$), 2011-2017. a. püütud emas- ja isassugukalade valimitel ($A_r = 6.4-6.8$) ja 2019-2020. a. püütud kääbusisaste valimitel ($A_r = 7.2$) ning sarnane 2019. a. püütud emas- ja isassugukalade valimiga ($A_r = 7.7$). Samas oli 2020. a. sugukalade ja kääbusisaste valimite tegelik heterosügootsus ($H_o = 0.75-0.76$) sarnane varasemate aastate valimitega ($H_o = 0.71-0.76$) (tabel 2).

Aastatel 2010-2020 Kunda jõest püütud noorkalade, emas- ja isassugukalade ning kääbusisaste üldine geneetiline diferentseeritus on madal ($F_{ST} = 0.013$), mis näitab, et alleelisageduste ajaline muutlikkus ei ole väga suur ja sellest tingitud variatsioon moodustab vaid 1.3% kogu geneetilisest variatsioonist. 2020. a. kogutud emas- ja isassugukalade (Kun20I+E) diferentseeritus varasemate aastate (2010-2019) noorkalade, emas- ja isassugukalade ning kääbusisaste valimitest on 0.000-0.025 ning 2020. a. kogutud kääbusisaste (Kun20KI) diferentseeritus varasemate aastate valimitest on 0.000-0.021.

Inbriidingukoefitsiendi F_{IS} väärtused on läbi aastate püsinud stabiilsena ja ei erine usaldusväärselt nullist (tabel 2). Seega sobivad Kunda jõest püütud emas- ja isassugukalad ja kääbusisased PKK Kunda lõhekarja genofondi muutlikkuse säilitamiseks ja täiendamiseks.

Tabel 2. Kunda lõhe 2010-2020 valimite geneetilist muutlikkust iseloomustavad näitajad (n – isendite arv, A – keskmine alleelide arv, A_r – alleelide rohkus, H_e ja H_o – oodatav ja tegelik keskmine heterosügootsus, F_{IS} - inbriidingukoefitsient). KI – kääbusisased, I – isased ja E – emased sugukalad

Aasta	Tähis	n	A	A_r	H_e	H_o	F_{IS}
2010	Kun10	21	7.5	6.7	0.73	0.72	0.014
2011	Kun11KI	60	8.5	6.4	0.73	0.71	0.029
2011	Kun11	57	8.7	6.6	0.71	0.71	0.006
2012	Kun12	63	9.4	6.6	0.74	0.74	-0.006
2013	Kun13	60	8.5	6.5	0.73	0.76	-0.046
2013	Kun13KI	43	8.3	6.6	0.75	0.75	-0.009
2015	Kun15	50	9.1	6.6	0.71	0.71	-0.011
2015	Kun15KI+I+E	53+8+5	9.5	6.8	0.73	0.76	-0.039
2016	Kun16KI+I+E	49+7+2	9.2	6.7	0.72	0.72	0.002
2017	Kun17	51	8.3	6.7	0.72	0.73	-0.003
2017	Kun17KI+E	4+13	7.5	7.4	0.74	0.75	-0.015
2019	Kun19	51	9.5	7.1	0.75	0.74	0.003
2019	Kun19KI	36	9.2	7.2	0.75	0.74	0.019
2019	Kun19I+E	9+10	8.5	7.7	0.75	0.72	0.044
2020	Kun20KI	57	9.6	7.2	0.75	0.76	-0.013
2020	Kun20I+E	11+9	8.6	7.6	0.76	0.75	0.011

3. Pärnu jõe lõhepopulatsiooni taastamise eesmärgil 2020. aastal Pärnu jõest püütud lõhe sugukalade geneetilised iseärasused

2020. aastal koguti PKK poolt Pärnu jõest püütud 19 lõhe sugukala (2 emas- ja 17 isaskala koeproovid. Nende geneetiliste iseärasuste välja selgitamiseks kasutasime võrdlusena aastatel 1997-2019 Pärnu ja Liivi lahe lõhepopulatsioonidest (Pärnu, Daugava, Gauja, Salaca, Venta) kogutud noor- ja sugukalade materjali (tabel 3).

Pärnu jõest 2020. aastal püütud lõhe sugukalade (Pär20S) alleelirohkus ($A_r = 5.8$) on sarnane 2017-2019 püütud sugukalade ($A_r = 5.9-6.1$) ja Pärnu jõe 1997., 1999/2000. ja 2017. a. noorkala valimite ($A_r = 5.8-6.2$) alleelirohkusega. Võrreldes Daugava lõhega on Pär20S alleelirohkus sarnane Daugava 1998. ja 2018. a. noorkalade valimitega ($A_r = 5.8-6.0$), kuid veidi kõrgem kui Daugava 2015.a. noorkalade valimil ning 2014. ja 2015. a. koorunud PKK Daugava sugukarja kaladel ($A_r = 5.4-5.6$; joonis 3 ja tabel 3). Pär20S sugukalade tegelik heterosügootsus ($H_o = 0.69$) ei erinenud oluliselt Pärnu ja Liivi lahe Läti populatsioonide varasematest sugu- ja noorkalade valimitest ($H_o = 0.67-0.74$; joonis 4 ja tabel 3). Samuti ei erinenud Pär20S sugukalade inbriidingukoefitsient F_{IS} statistiliselt oluliselt nullist (tabel 3). Hübriidseid ja triploidseid isendeid Pär20S sugukalade seas ei esinenud.

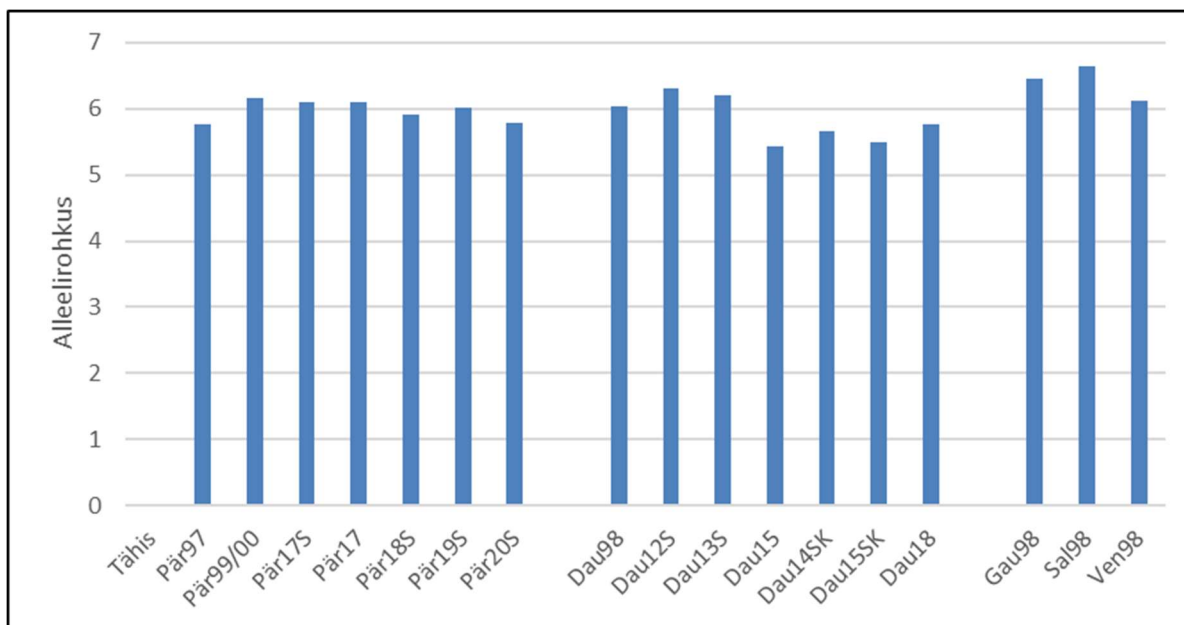
Tõsiseks probleemiks on aga väga väike 2020.a. kasutatud sugukalade arv Pärnu jõe lõhe populatsiooni taastootmiseks. Kahe emaskala mari viljastati kokku 5 isaskala niisaga ning kahe isaskala niiska kasutati ka PKK Daugava lõhe sugukarja (Dau15SK) emaskalade marja viljastamiseks. Kahe emaskala viljastamine 5 isase niisaga annab efektiivseks populatsiooni suuruseks vaid 5.7, millega kaasneb järglaskonna inbriidingukoefitsiendi F oodatav suurenemine 0.088 (ehk 9%) võrra ja haruldasemate alleelide väga kõrge tõenäosusega kaotsimine. **Sellise oluliselt madalama geneetilise muutlikkuse ja kõrgendatud inbriidingukoefitsiendiga järglaskonna kalade asustamine mõjutab negatiivselt ka Pärnu jõe lõhepopulatsiooni genofondi ja tekitab kasu asemel pigem kahju.** Kui Pärnu jõest ei õnnestu püüda piisavat arvu lõhe sugukalu, siis tuleks asustatavate noorkalade tootmiseks kindlasti täiendavalt kasutada suuremat arvu PKK Daugava sugukarja kalu. Enne noorkalade

asustamist Pärnu jõkke oleks edaspidi soovitatav hinnata nende maimude või 0+ valimi põhjal asustatamisele minevate kalade kvaliteeti ja geneetilise muutlikkuse taset.

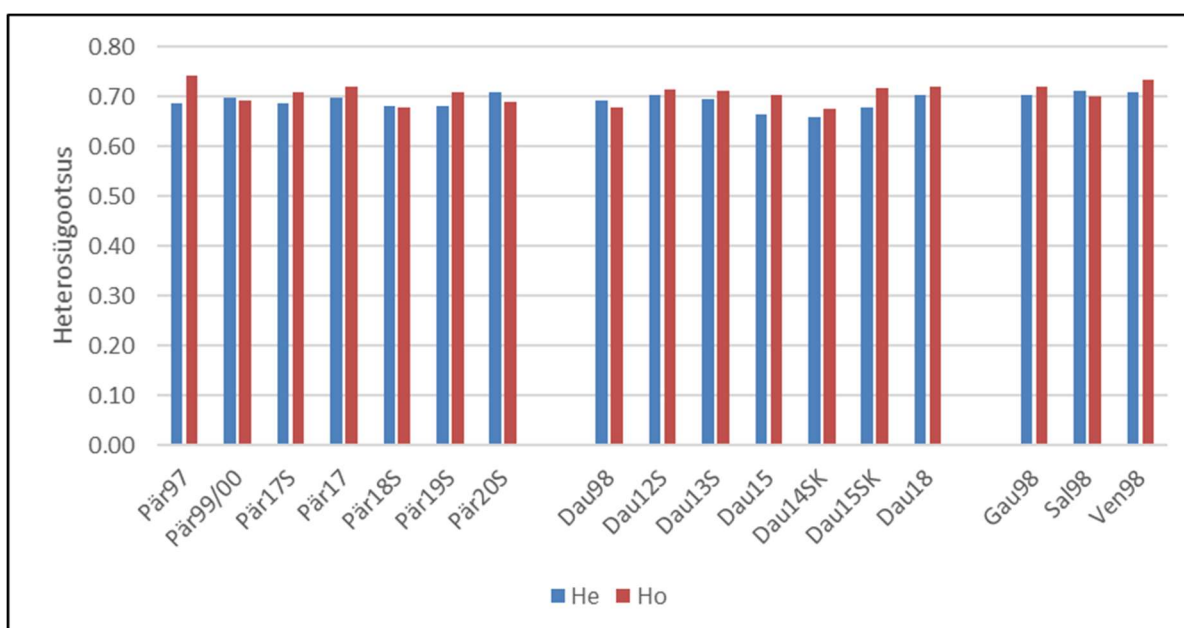
Tabel 3. Pärnu jõe ja Liivi lahe lõhepopulatsioonide geneetilist muutlikkust iseloomustavad näitajad (n – isendite arv, A – keskmine alleelide arv, A_r – alleelirohkus, H_e ja H_o – oodatav ja tegelik keskmine heterosügootsus, F_{IS} - inbriidingukoefitsient).

Populatsioon	Proovi kogumise aasta	Tähis	n	A	A_r	H_e	H_o	F_{IS}
Pärnu	1997	Pär97	24	6.5	5.8	0.69	0.74	-0.082
	1999, 2000	Pär99/00	37	7.8	6.2	0.70	0.69	0.007
	2017	Pär17S	24	6.9	6.1	0.69	0.71	-0.034
	2017	Pär17	96	8.5	6.1	0.70	0.72	-0.035
	2018	Pär18S	37	7.4	5.9	0.68	0.68	0.002
	2019	Pär19S	15	6.1	6.0	0.68	0.71	-0.049
	2020	Pär20S	19	6.2	5.8	0.71	0.69	0.029
<i>Keskmine, Pärnu</i>				7.0	6.0	0.69	0.71	-0.023
Daugava	1998	Dau98	86	8.6	6.0	0.69	0.68	0.020
	2012	Dau12S	44	8.2	6.3	0.70	0.71	-0.016
	2013	Dau13S	36	7.6	6.2	0.69	0.71	-0.025
	2015	Dau15	88	7.1	5.4	0.66	0.70	-0.058
	2017	Dau14SK	141	7.4	5.6	0.66	0.67	-0.022
	2018	Dau15SK	135	7.3	5.5	0.68	0.72	-0.056
	2018	Dau18	100	7.6	5.8	0.70	0.72	-0.023
<i>Keskmine, Daugava</i>				7.7	5.8	0.68	0.70	-0.026
Gauja	1998	Gau98	50	8.5	6.5	0.70	0.72	-0.022
Salaca	1998	Sal98	50	8.8	6.6	0.71	0.70	0.014
Venta	1998	Ven98	49	7.2	6.1	0.71	0.73	-0.035

* S – jõest püütud sugukalad, SK – sugukari Põlulas



Joonis 3. Pärnu jõe ja Liivi lahe lõhepopulatsioonide/karjade alleelirohkus



Joonis 4. Pärnu jõe ja Liivi lahe lõhepopulatsioonide/karjade keskmine oodatav (H_e) ja tegelik (H_o) heterosügootsus.

4. Pärnu jõest 2020.a. püütud hõredapiilise siirdesiia sugukalade geneetilised iseärasused

2020.a. uuringu raames saime PKK-st Pärnu jõest püütud hõredapiilise siirdesiia sugukalade (104 isendit, s.h. 7 emast ja 97 isast) proovid, kellest 3 isendi koeproovid olid tugevalt kontamineeritud, s.t. nendelt eraldatud DNA amplifitseerimisel esines uuritud markerlookustes rohkem kui 2 alleeli ehk mitme isendi alleelide segu. See näitab, et koeproovide kogumisel ei järgitud piisavalt töövahendite hoolika puhastamise nõuet. Nende 3 isendi genotüübid eemaldati andmeanalüüsist. Geneetiliseks analüüsiks kasutasime 12 mikrosatelliitmarkerist koosnevat paneeli. Edukalt õnnestus amplifitseerida ja genotüpiseerida 11 mikrosatelliitmarkerit, kuid ühes nendest (Cisco-126) esines kõigis valimites heterosügootide defitsiit, mistõttu jätsime selle lookuse välja ja kasutasime geneetiliste iseärasuste analüüsis 10 markerilookuse genotüüpe. Võrdlusmaterjalina kasutasime sama populatsiooni 2004-2006 noorkalade, 2015-2019 jõest püütud sugukalade ja 2016-2017 koorunud PKK sugukarja valimeid (tabel 4). Geneetilist muutlikkust iseloomustati kõigi uuritud markerilookuste keskmise tegeliku ja teoreetiliselt oodatava heterosügootsusena (vastavalt H_o ja H_e) ning markerilookustes esinevate erinevate DNA järjestuste ehk alleelide keskmise arvuna (A) ja selle valimi suurusele korrigeeritud väärtusena ehk alleelirohkusena (A_r). Populatsioonide, karjade ja nende erinevate aastaklasside geneetilist diferentseeritust hinnati indeksi F_{ST} põhjal. Lähisuguluspaaritustest (õde-vend, vanem-järglane jne.) tingitud inbriidingu taset iseloomustasime inbriidingukoefitsiendi F_{IS} abil.

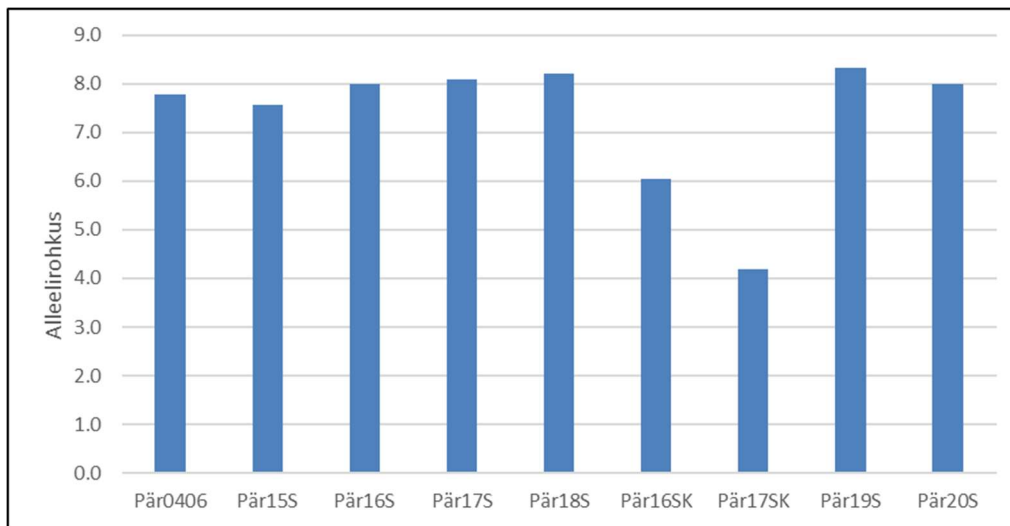
Pärnu jõest 2020. a. püütud hõredapiilise siirdesiia sugukalade geneetilist muutlikkust iseloomustavad näitajad (alleelirohkus ja keskmine heterosügootsus) ei erinenud oluliselt Pärnu jõest varasematel aastatel kogutud valimitest (tabel 4, joonised 5 ja 6), mis näitab, et Pärnu siirdesiia geneetiline muutlikkus on ajaliselt stabiilne (seda toetab ka Pärnu jõest püütud sugukalade erinevate aastate valimite vahelist geneetilist diferentseerumist iseloomustava F_{ST} indeksi väärtus 0.000-0.003). Samuti ei erinenud kõigi Pärnu jõest püütud siirdesiia sugukalade valimite inbriidingukoefitsient statistiliselt oluliselt nullist (tabel 4). Seega esindasid 2020. a. kogutud sugukalad hästi Pärnu siirdesiia geneetilist muutlikkust ja sobivad taastootmiseks. **Probleemiks on aga jätkuvalt väga väike emaste arv püütud sugukalade hulgas.** 2019. aastal

saadi 7 emaskala, kellest marja saadi vaid kahelt isendilt (teistel oli kas mari kinni või olid nad juba ära kudenud). Nende kahe emaskala viljastamiseks kasutati 8 isase niiska, mis annab efektiivseks populatsiooni suuruseks vaid 6, millega kaasneb järglaskonna inbriidingukoefitsiendi oodatav suurenemine 7.8% võrra ja haruldasemate alleelide väga kõrge tõenäosusega kaotsimine (tõenäosusega 0.89 alleelidel, mille sagedus on 0.01 ja tõenäosusega 0.54 alleelidel, mille sagedus on 0.05). **2020. aastal saadi samuti vaid 7 emaskala, marja õnnestus saada 6 isendilt ja see viljastati 14 isase niisaga, mis annab efektiivseks populatsiooni suuruseks 16.8. Sellega kaasneb järglaskonna inbriidingukoefitsiendi oodatav suurenemine 3.0% võrra ja haruldasemate alleelide kõrge tõenäosusega kaotsimine (tõenäosusega 0.71 alleelidel, mille sagedus on 0.01 ja tõenäosusega 0.18 alleelidel, mille sagedus on 0.05). Sellise oluliselt madalama geneetilise muutlikkuse ja kõrgendatud inbriidingukoefitsiendiga järglaskonna kalade asustamine mõjutab negatiivselt Pärnu jõe hõredapiilise siirdesiia looduliku populatsiooni genofondi ja tekitab kasu asemel pigem kahju.**

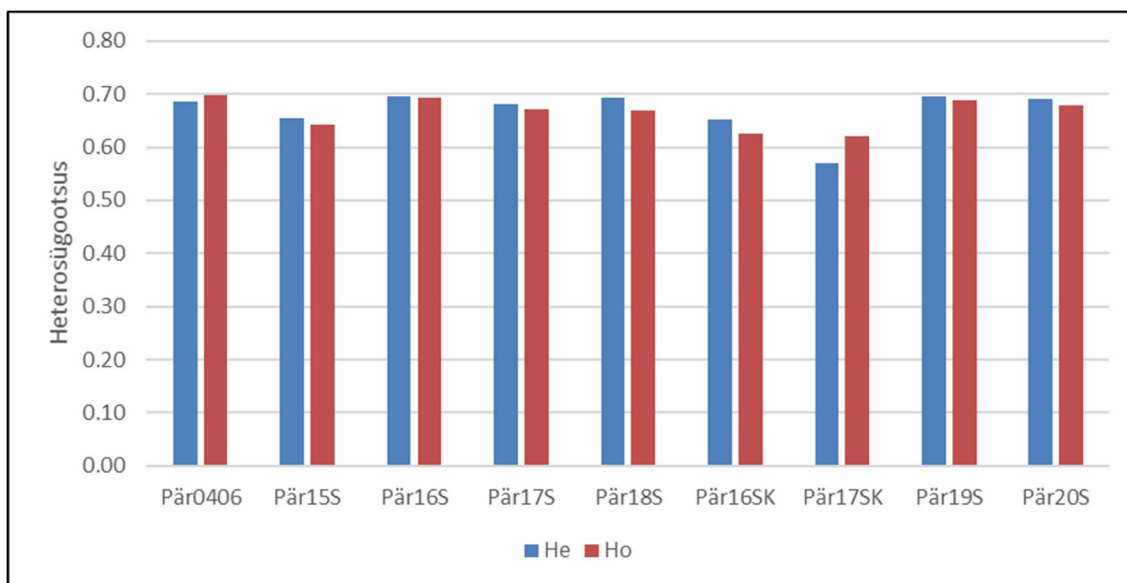
Tabel 4. Pärnu jõe hõredapiilise siirdesiia valimite geneetilist muutlikkust iseloomustavad näitajad (n – isendite arv, A – keskmine alleelide arv, A_r – alleelide rohkus, H_e ja H_o – oodatav ja tegelik keskmine heterosügootsus, F_{IS} - inbriidingukoefitsient).

Populatsioon	Proovi kogumise aasta	Tähis ^a	n	A	A_r	H_e	H_o	F_{IS}
Pärnu	2004, 2006	Pär0406	50	8.8	7.8	0.69	0.70	-0.017
	2015	Pär15S	41	8.4	7.6	0.66	0.64	0.022
	2016	Pär16S	25	8.0	8.0	0.69	0.69	0.004
	2017	Pär17S	51	9.4	8.1	0.68	0.67	0.017
	2018	Pär18S	116	10.7	8.2	0.69	0.67	0.033
	2018	Pär16SK	124	7.0	6.0	0.65	0.63	0.039
	2019	Pär17SK	45	4.4	4.2	0.57	0.62	-0.091
	2019	Pär19S	124	10.5	8.3	0.70	0.69	0.012
	2020	Pär20S	101	10.3	8.0	0.69	0.68	0.019
Keskmine				8.6	7.4	0.67	0.66	0.004

^a S – jõest kogutud sugukalad; SK – Põlula sugukari



Joonis 5. Pärnu hõredapiilise siirdesiia valimite alleelirohkus



Joonis 6. Pärnu hõredapiilise siirdesiia valimite keskmine oodatav (H_e) ja tegelik (H_o) heterosügootsus.

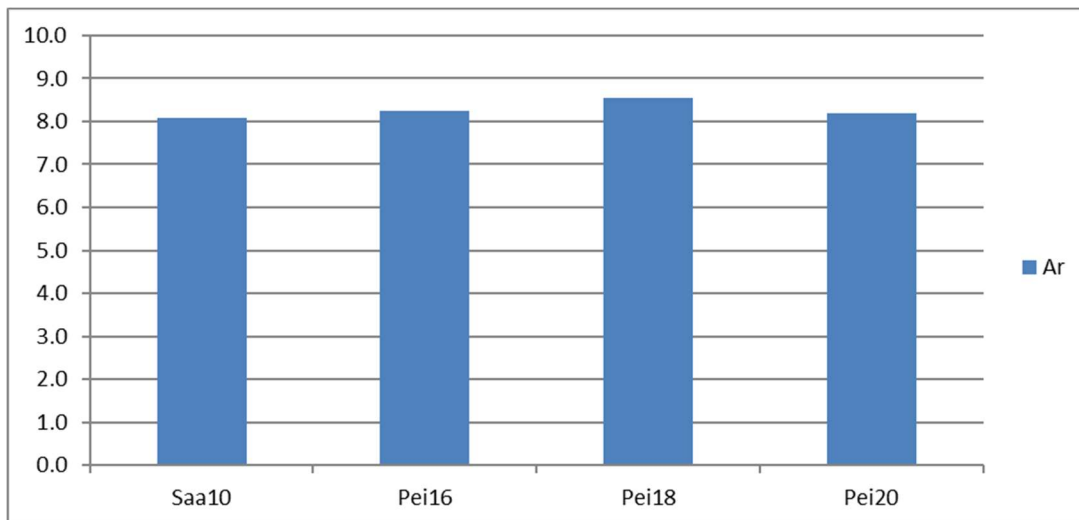
5. Peipsi järvest 2020. a. püütud siia sugukalade geneetilised iseärasused

2020.a. uuringu raames saime PKK-st Peipsi järvest püütud siia 287 sugukala (101 emast ja 186 isast) proovid. Võrdlusmaterjalina kasutasime peipsi siia 2010. aastal Saadjärvest ning 2016. ja 2018. aastal Peipsi järvest püütud valimeid (tabel 5). Geneetiliseks analüüsiks kasutasime sama 12 mikrosatelliitmarkerist koosnevat paneeli, mis Pärnu siirdesiia puhul. Geneetilist muutlikkust iseloomustati kõigi uuritud markerilookuste keskmise tegeliku ja teoreetiliselt oodatava heterosügootsusena (vastavalt H_o ja H_e) ning markerilookustes esinevate erinevate DNA järjestuste ehk alleelide keskmise arvuna (A) ja selle valimi suurusele korrigeeritud väärtusena ehk alleelirohkusena (A_r). Populatsioonide, karjade ja nende erinevate aastaklasside geneetilist diferentseeritust hinnati indeksi F_{ST} põhjal. Lähisuguluspaaritustest (õde-vend, vanem-järglane jne.) tingitud inbriidingu taset iseloomustasime inbriidingukoefitsiendi F_{IS} abil.

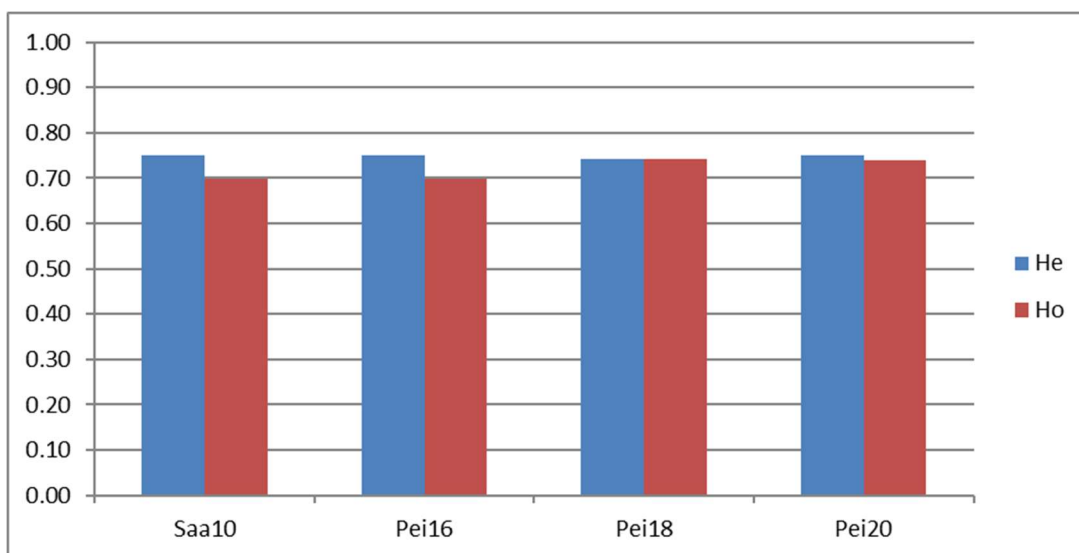
Peipsi siia sugukalade 2020. a. valimi (Pei20) geneetilist muutlikkust iseloomustavad näitajad (alleelirohkus ja keskmine heterosügootsus) ei erinenud varasemate aastate valimitest (tabel 5, joonised 9 ja 10), mis näitab, et peipsi siia geneetiline muutlikkus on ajaliselt stabiilne. Seda toetab ka erinevate aastate valimite vahelist geneetilist diferentseerumist iseloomustava F_{ST} indeksi väärtus 0. Samuti ei erinenud kõigi peipsi siia valimite inbriidingukoefitsient statistiliselt oluliselt nullist. Pei20 sugukalade valim sobib hästi peipsi siia taastootmiseks.

Tabel 5. Peipsi siia valimite geneetilist muutlikkust iseloomustavad näitajad (n – isendite arv, A – keskmine alleelide arv, A_r – alleelide rohkus, H_e ja H_o – oodatav ja tegelik keskmine heterosügootsus, F_{IS} - inbriidingukoefitsient).

Populatsioon	Proovi kogumise aasta	Tähis	n	A	A_r	H_e	H_o	F_{IS}
Saadjärv	2010	Saa10	21	8.2	8.1	0.75	0.70	0.072
Peipsi	2016	Pei16	38	10.1	8.2	0.75	0.70	0.072
	2018	Pei18	28	9.7	8.5	0.74	0.74	0.001
	2020	Pei20	287	15.4	8.2	0.75	0.74	0.016
Keskmine				10.9	8.3	0.75	0.72	0.040



Joonis 9. Peipsi siia valimite alleelirohkus



Joonis 10. Peipsi siia valimite keskmine oodatav (H_e) ja tegelik (H_o) heterosügootsus

Kokkuvõte

1. Lepingu raames saime 2020. a. RMK Põlula kalakasvandusest (edapidi PKK) geneetiliseks analüüsiks kokku 541 kala koeproovid, s.h. 47 Kunda lõhe sugukarja asenduskala, 84 Kunda jõest püütud lõhe sugukala ja kääbusisast, 19 Pärnu jõest püütud lõhe sugukala, 104 Pärnu jõest püütud siirdesiia sugukala ja 287 Peipsi järvest püütud siia sugukala.
2. PKK-s peetava Kunda lõhe elusgeenipanga 2017. aastal koorunud asenduskarja (kiibistatud 2020) hulgas esines ühel kalal (kiibi number 62D5) triploidusele viitavaid genotüüpe ning see isend tuleks asenduskarjast praakida. 2017. a. koorunud asenduskarja kalade alleelirohkus on sarnane 2011., 2014., 2015. ja 2016. a. koorunud aastakäikudega ning keskmine oodatav ja tegelik heterosügootsus on sarnane 2008-2016 aastaklassidega, mis näitab kasutatud sugukalade suure arvu ja erinevate aastakäikude sugukalade paaritamise positiivset mõju. Lähisuguluspaaritustest (õde-vend, vanem-järglane jne.) tingitud inbriidingu taset iseloomustava inbriidingukoefitsiendi F_{IS} väärtused ei erine kõigis uuritud Kunda geenipanga aastaklassides statistiliselt oluliselt nullist, mis näitab, et lähisuguluspaaritused pole seni olnud probleemiks. Kunda sugukarja erinevate aastaklasside üldine geneetiline diferentseeritus on madal ($F_{ST} = 0.016$), mis näitab, et alleelisageduste ajaline muutlikkus ei ole väga suur ja sellest tingitud variatsioon moodustab vaid 1.6% kogu geneetilisest variatsioonist. 2017. a. koorunud asenduskarja (Kun2017S) diferentseeritus 2008-2016 aastaklassidest on 0.006-0.017 ning 0-põlvkonnast (Kun2001S) 0.014, mis näitab, et Kun2017S aastaklass on DNA markerlookuste alleelisageduste poolest üsna sarnane 2001.-2002. a. Kunda jõest püütud noorkalade baasil loodud Kunda sugukarja 0-põlvkonnaga ja geenipanga 2008-2016 aastaklassidega.
3. Olukorras, kus lõhe asustamise vajadus Põhja-Eesti jõgedesse on vähenenud võib tekkida küsimus, kas see peaks väljenduma ka PKKs peetava Kunda lõhe sugukarja suurusel. Tuleb rõhutada, et geneetilise mitmekesisuse säilitamiseks ja inbriidingu suurenemise ära hoidmiseks nii geenipanga sugukarjas kui nende järglastega asustatud populatsioonides ei tohi paljundamisel vähendada efektiivse populatsiooni suurust alla teaduslikult põhjendatud soovituslike väärtuste, sest vastasel korral on negatiivsed muutused genofondis vältimatud. Sugukarja suuruse optimeerimiseks võiks geenipangas pidada ainult (või peamiselt) emaseid sugukalu (kasutades paljundamisel 50-100 isendit) ja

nende marja viljastamiseks kasutada kas loodusest püütud isaskalade ja/või sügavkülmutatud geenipanga isaste spermat. Krüogeenipanga loomine ja pidamine eeldab vastava infrastruktuuri olemasolu ja personali väljaõpet PKK-s, millega alustati 2016. aastal. Kunda lõhe asenduskarja 2016. aastal koorunud 3+ isaskalade spermat sügavkülmutati esmakordselt 2019. aastal, kasutades selleks Kehtna seemendusjaama laboratooriumi infrastruktuuri. Geograafilise kauguse tõttu oleks siiski otstarbekam vastav struktuur välja arendada kohapeal PKK-s. Meie poolt esmakordselt 2019. a. rakendatud Y-kromosoomi spetsiifilise geneetilise markeri abil on võimalik määrata lõhe asenduskarja kalade sugupoolt ka mittesuguküpsetel isenditel, kelle fenotüübiline sugu pole visuaalselt määratav. See võimaldab optimeerida sugukarjas peetavate kalade sugupoolte suhet varasemalt kui seni ning säästa sellega sugukarja pidamiseks vajalikke ressursse.

4. 2020. a. sügisel Kunda jõest püütud 9 emassugukala, 11 isassugukala ja 64 varasuguküpsenn. "kääbusisase" geneetilise puhtuse ja kvaliteedi analüüs näitas, et hübriidseid ja triploidseid isendeid uuritud kalade seas ei esinenud. Küll aga olid 7 kääbusisase koeproovid tugevalt kontamineeritud, s.t. nendelt eraldatud DNA amplifitseerimisel esines uuritud markerlookustes rohkem kui 2 alleeli ehk mitme isendi alleelide segu. See näitab, et koeproovide kogumisel kääbusisastelt ei järgitud piisavalt töövahendite hoolika puhastamise nõuet. 2020. a. püütud emas- ja isassugukalade alleelirohkus oli mõnevõrra kõrgem kui 2010-2019. a. Kunda jõe noorkalade valimitel, 2011-2017. a. püütud emas- ja isassugukalade valimitel ja 2019-2020. a. püütud kääbusisaste valimitel ning sarnane 2019. a. püütud emas- ja isassugukalade valimiga. Samas oli 2020. a. sugukalade ja kääbusisaste valimite tegelik heterosügootsus sarnane varasemate aastate valimitega. Aastatel 2010-2020 Kunda jõest püütud noorkalade, emas- ja isassugukalade ning kääbusisaste üldine geneetiline diferentseeritus on madal ($F_{ST} = 0.013$), mis näitab, et alleelisageduste ajaline muutlikkus ei ole väga suur ja sellest tingitud variatsioon moodustab vaid 1.3% kogu geneetilisest variatsioonist. Inbriidingukoefitsiendi väärtused on läbi aastate püsinud stabiilsena ja ei erine usaldusväärselt nullist. Seega sobivad Kunda jõest püütud emas- ja isassugukalad ja kääbusisased RMK Põlula kalakasvatustalituses peetava Kunda lõhekarja genofondi muutlikkuse säilitamiseks ja täiendamiseks.
5. Pärnu jõest 2020. aastal püütud lõhe sugukalade (Pär20S) alleelirohkus on sarnane 2017-2019 püütud sugukalade ja Pärnu jõe 1997., 1999/2000. ja 2017. a. noorkala valimite

alleelirohkusega. Võrreldes Daugava lõhega on Pär20S alleelirohkus sarnane Daugava 1998. ja 2018. a. noorkalade valimitega, kuid veidi kõrgem kui Daugava 2015.a. noorkalade valimil ning 2014. ja 2015. a. koorunud PKK Daugava sugukarja kaladel. Pär20S sugukalade tegelik heterosügootsus ei erinenud oluliselt Pärnu ja Liivi lahe Läti populatsioonide varasematest sugu- ja noorkalade valimitest. Samuti ei erinenud Pär20S sugukalade inbriidingukoefitsient statistiliselt oluliselt nullist. Hübriidseid ja triploidseid isendeid Pär20S sugukalade seas ei esinenud. Tõsiseks probleemiks on aga väga väike 2020.a. kasutatud sugukalade arv Pärnu jõe lõhe populatsiooni taastootmiseks. Kahe emaskala mari viljastati kokku 5 isaskala niisaga, mis annab efektiivseks populatsiooni suuruseks vaid 5.7. Sellega kaasneb järglaskonna inbriidingukoefitsiendi oodatav suurenemine 9% võrra ja haruldasemate alleelide väga kõrge tõenäosusega kaotsimine. Sellise oluliselt madalama geneetilise muutlikkuse ja kõrgendatud inbriidingukoefitsiendiga järglaskonna kalade asustamine mõjutab negatiivselt ka Pärnu jõe lõhepopulatsiooni genofondi ja tekitab kasu asemel pigem kahju. Kui Pärnu jõest ei õnnestu püüda piisavat arvu lõhe sugukalu, siis tuleks asustatavate noorkalade tootmiseks kindlasti täiendavalt kasutada suuremat arvu PKK Daugava sugukarja kalu. Enne noorkalade asustamist Pärnu jõkke oleks edaspidi soovitatav hinnata nende maimude või 0+ valimi põhjal asustatamisele minevate kalade kvaliteeti ja geneetilise muutlikkuse taset.

6. Pärnu jõest 2020. a. püütud hõredapiilise siirdesiia sugukalade geneetilist muutlikkust iseloomustavad näitajad (alleelirohkus ja keskmine heterosügootsus) ei erinenud oluliselt Pärnu jõest varasematel aastatel kogutud valimitest, mis näitab, et Pärnu siirdesiia geneetiline muutlikkus on ajaliselt stabiilne. Samuti ei erinenud kõigi Pärnu jõest püütud siirdesiia sugukalade valimite inbriidingukoefitsient statistiliselt oluliselt nullist. Seega esindasid 2020. a. kogutud sugukalad hästi Pärnu siirdesiia geneetilist muutlikkust ja sobivad taastootmiseks. Probleemiks on aga jätkuvalt väga väike emaste arv püütud sugukalade hulgas. 2020. aastal saadi sarnaselt 2019. aastaga vaid 7 emaskala, marja õnnestus saada 6 isendilt ja see viljastati 14 isase niisaga, mis annab efektiivseks populatsiooni suuruseks 16.8. Sellega kaasneb järglaskonna inbriidingukoefitsiendi oodatav suurenemine 3.0% võrra ja haruldasemate alleelide kõrge tõenäosusega kaotsimine. Sellise oluliselt madalama geneetilise muutlikkuse ja kõrgendatud inbriidingukoefitsiendiga järglaskonna kalade asustamine mõjutab negatiivselt Pärnu jõe

hõredapiilise siirdesiia looduliku populatsiooni genofondi ja tekitab kasu asemel pigem kahju. Enne siia noorkalade asustamist Pärnu jõkke oleks edaspidi soovitatav hinnata nende maimude või 0+ valimi põhjal asustatamisele minevate kalade kvaliteeti ja geneetilise muutlikkuse taset.

7. Peipsi siia sugukalade 2020. a. valimi geneetilist muutlikkust iseloomustavad näitajad (alleelirohkus ja keskmine heterosügootsus) ei erinenud varasemate aastate valimitest, mis näitab, et peipsi siia geneetiline muutlikkus on ajaliselt stabiilne. Seda toetab ka erinevate aastate valimite vahelist geneetilist diferentseerumist iseloomustava F_{ST} indeksi väärtus 0. Samuti ei erinenud kõigi peipsi siia valimite inbriidingukoefitsient statistiliselt oluliselt nullist. Peipsi siia sugukalade 2020. a. valim sobib hästi peipsi siia taastootmiseks.

Lisa 1. Kunda lõhe asenduskarja 2020. a. kiibistatud 3+ kalade geneetilise puhtuse ja genotüübilise soo määramise tulemused

Proovi nr.	Kiibi nr.	Fenotüübiline sugu (e või i)	Genotüübiline sugu (E või I)	Pikkus (cm)	Mass (g)	Märkused
1	4734	i	I	42	785	
2	4FEA	i	I	45	1170	
3	2E7F	i	I	46	1065	
4	6ACA	i	I	44	935	
5	3D70	i	I	41	850	
6	6573	i	I	43	975	
7	64DE	i	I	45	965	
8	74E5	i	I	49	1345	
9	57BB	i	I	49	1380	
10	62D5	i	I	37	695	Triploid!
11	6586	i	I	49	1450	
12	A1D9	i	I	48	1340	
13	578F	i	I	53	1605	
14	5363	i	I	37	570	
15	6A79	i	I	44	970	
16	5462	i	I	48	1225	
17	ACE1	i	I	51	1600	
18	49F3	i	I	39	640	
19	6B4D	i	I	43	950	
20	6C60	i	I	63	2630	
21	9957	i	I	52	1525	
22	A3D8	i	I	45	1005	
23	4C92	i	I	42	845	
24	28B4	i	I	42	905	
25	8A3A	i	I	56	2330	
26	C401	i	I	45	1040	
27	40F9	i	I	36	600	
28	541C	i	I	38	590	
29	41C7	i	I	56	2070	
30	C6B2	i	I	42	795	
31	80B8	i	I	47	1210	
32	3AB0	i	I	36	565	
33	C5FA	i	I	40	605	
34	AA12	i	I	45	1055	
35	2D6E	i	I	48	1245	
36	354A	i	I	42	830	

37	41B1	i		61	3060	
38	C553	i		41	900	
39	7CBA	i		49	1220	
40	874C	i		33	410	
41	'8E58	i		33	425	
42	BEDE	i		48	1330	
43	4890	i		43	1125	
44	CA0B	i		44	1020	
45	359C	i		44	1000	
46	A5CA	i		41	755	
47	2BB5	i		46	1155	