

Pekka Heiskanen

Raportti (27.11.2024): Puolanka – Raakun havainnointi eDNA menetelmillä

Projektin johdanto

Asiakas halusi toteuttaa eDNA-selvityksen puolangalla. Hankeen näytteenoton ja sen suunnittelun toteutti Ecobio ja laboratorioanalyysin ja raportoinnin toteutti SpringDNA.

Raakun ekologia

Jokihelmisimpukka eli raakku (*Margaritifera margaritifera*) on suuri makeanveden simpukka, joka on Suomessa rauhoitettu vuonna 1955 ja joka on luokiteltu vuodesta 2010 lähtien Suomessa erittäin uhanalaiseksi. Lisäksi laji kuuluu EU:n luontodirektiivin lajilistoihin II ja V joissa sen todetaan olevan Euroopan unionin tärkeänä pitämä laji, jonka suotuisa suojelutaso on pyrittävä säilyttämään tai palauttamaan.

Suurimpia uhkia lajille ovat vesirakentaminen, ojitus ja turpeenotto, lohikantojen heikentyminen, helmenpyynti ja vesistöjen saastuminen. Kantoja on saatu osittain elvytettyä tehokkaan suojelun ansiosta.

Lajin suurimmat esiintyvyydet Suomessa ovat Lapin ja Koillismaan puhtaissa ja aktiivisesti virtaavissa joissa. Etelä-Suomessa lajin ainoa lisääntyvä kanta löytyy Ylöjärven Ruonanjoesta ja paikoitellen sitä esiintyy myös muualla Länsi-Suomessa. Laji pysyy pitkään paikallaan ja se saa ravintonsa vedestä suodattamalla.

Jokihelmisimpukka voi kasvaa kooltaan jopa yli 15cm mittaiseksi ja elää yli 200-vuotiaaksi. Sen kuori on väritykseltään tumma tai jopa musta, sen poikittaiset kasvurenkaat ovat hyvin tiheässä ja se on lukkohampaallinen. Ulkomuodoltaan se muistuttaa hieman munuaista ja kuoren alareuna on usein hieman kovera.

Jokihelmisimpukka saavuttaa sukukypsyyden n. 20-vuotiaana. Lisääntyäkseen jokihelmisimpukka tarvitsee joessa elävän lohi- tai taimenkannan, jonka kiduksiin sen glokidium-toukat voivat kiinnittyä ja elää niissä kiinnittyneinä talven yli. Keväällä toukat tiputtautuvat joen pohjalle ja kaivautuvat sedimenttiin n. 2-3 vuodeksi. Nuorien raakkujen määrä Suomen populaatioissa on pieni ja ne muodostuvat pääasiassa vanhoista yksilöistä.

<https://laji.fi/taxon/MX.212403>

<https://www.metsa.fi/luonto-ja-kulttuuriperinto/lajien-suojelu/raakku/>

<https://punainenkirja.laji.fi/>

Näytteenotto

eDNA on eliöiden ympäristöön levittämää DNA materiaalia joko vapaina DNA fragmentteina, sitoutuneina irrallisiin soluihin, kudoksiin, limaun, karvoihin yms. Tämä eDNA on mahdollista kerätä tarkoitukseen valmistetuilla eDNA filtereillä. Kun eDNA on kerätty, tulee se säilöä asianmukaisesti säilöntäaineeseen ja toimittaa laboratorioon analysoitavaksi.

Näytteenotto toteutettiin yleisten eDNA standardien mukaisesti niin, että näytteenottopisteiltä otettiin varsinainen näyte, rinnakkaisnäyte sekä negatiivinen kontrollinäyte kaupallisesta lähdevedestä, jonka tarkoitus on kontrolloida kenttäolosuhteissa mahdollisia kontaminaatioita. Jos kaupasta ostetusta lähdevedestä saadaan laboratoriossa korkeita DNA konsentraatioita, sekä positiivinen tulos suhteessa tutkittavaan lajiin, tarkoittaa se sitä, että näytteenottaja itse on kontaminoinut negatiiviset kontrollit tutkittavan eliön DNA:lla. Edellämainittu tietysti tarkoittaa sitä, että biologisten näytteiden kohdallakaan positiivisiin tuloksiin ei täten voi luottaa. Näytteet otettiin Sylphium eDNA 0.8µm sampling kitillä.

Yksi merkittävimmistä keinoista luotettavuuden parantamiseksi eDNA menetelmissä on näytemäärien kasvattaminen. Pienempien huokoskokojen filtrit toisaalta sitovat tehokkaammin eDNA:ta, mutta tukkeutuvat nopeammin jolloin näytetilavuuden määrä laskee. Aiemmissa raakkuselvityksissä ja muiden asiantuntijoiden ohjeistamana olemme nykytiedon perusteella todenneet 0.8µm filtrit sopivaksi raakun havainnointiin.

Näytteenotto suoritettiin 24.10 Ecobion toimesta.

Laboratorioanalyysit

eDNA analysoitiin laboratoriossa qPCR-menetelmällä.. Yhden tai muutaman lajin havainnointi toteutetaan normaalisti PCR menetelmillä ja tätä kutsutaan yleisesti termillä "barcoding". PCR soveltuu barcodaukseen mainiosti, sillä se on nopea ja tarkka menetelmä DNA molekyylien havaitsemiseen, sekä niiden lukumäärien laskemiseen.

Eliölajit poikkeavat toisistaan DNA -sekvenssin perusteella evolutiivisista syistä johtuen. Nämä eroavaisuudet toimivat perustana niiden erottelulle molekulaarisesti. Ympäristönäytteistä kerättyjen DNA-molekyylien analyysi perustuu useimmiten mitokondriaalisten geenien havainnointiin kahdesta syystä. Ensinnäkin mitokondrioita on vähintään 10-100 kertainen määrä soluihin verrattuna, ja esimerkiksi yksi lihassolu voi pitää sisällään jopa tuhansia mitokondrioita. Toiseksi mitokondriaalisen DNA:n konservoitumisaste on optimaalinen, eli sen mutaationopeus on tarpeeksi suuri, jotta eri lajien geneeissä on tunnistettavia eroja mutta toisaalta mutaationopeus on tarpeeksi hidas, jotta lajien sisäinen vaihtelu pysyy keskimäärin tunnistettavana. Yleisimpiä barcodauksessa käytettäviä genejä ovat mitokondriaaliset COI (sytokromioksidaasi I) ja CYB (sytokromi B).

PCR (Polymerase chain reaction) on lämpötilan ohjaama reaktio, joka tapahtuu koeputkessa PCR-laitteen sisällä. DNA on 2-juosteinen molekyyli, jonka juosteet voidaan erottaa toisistaan korkeissa lämpötiloissa.

PCR-reaktion 1. Vaiheessa PCR-laite nostaa lämpötilan korkeaksi n. 95 asteeseen, jolloin DNA-juosteet erkanevat toisistaan. 2. Vaiheessa lämpötilaa lasketaan hieman n. 60 asteeseen, jolloin DNA-juosteet pääsevät takaisin pariutumaan. Jos reaktioon on lisätty pieni fragmentti (aluke) DNA:ta tutkittavasta kohteesta, tarrautuu tämä aluke vapaana oleviin DNA-juosteisiin. 3. Vaiheessa lämpötilaa nostetaan taas hieman, koska reaktioon lisätty DNA-polymeraasi aktivoituu tietyssä lämpötilassa. Tällöin DNA-polymeraasi tarrautuu alukkeen kohtaan ja alkaa syntetisoida uutta DNA-juostetta vastinparille. Tämä johtaa siihen, että kohde eliön DNA:n määrä tuplaantuu jokaisen 3-vaiheisen syklin tuloksena jos näytteessä on DNA:ta, johon lisäämämme aluke tarrautuu kemiallisesti. Jos DNA molekyylien tuplaantumista tapahtuu, voidaan tämä havaita PCR-laitteisiin rakennetuilla luminometrisillä antureilla. Toisin sanoen, jos DNA:n tuplaantumista tapahtuu PCR-reaktiossa, on näyte positiivinen ja jos sitä ei tapahdu on näyte negatiivinen.

Alla lueteltuna projektissa käytetyt primerit ja probet:

Jokihelmisimpukka:

Forward primer: 5'- TTG TTG ATT CGT GCT GAG TTA GG-3'

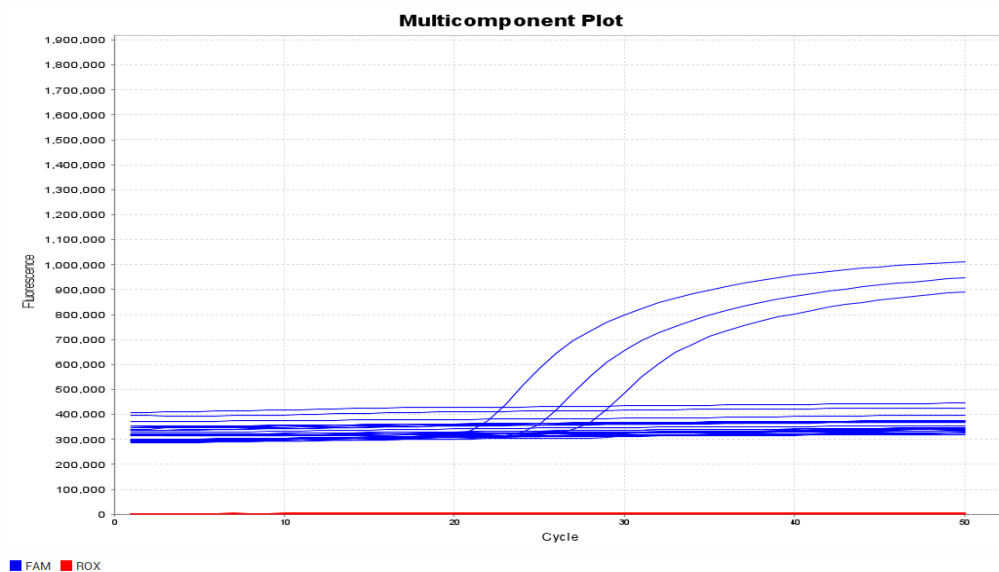
Reverse primer: 5'- GCA TGA GCC GTA ACA ATA ACA TTG-3'

Probe: 5'-6-FAM 5'- CCT GGT TCT TTG CTG GGT-3'

<https://edna-validation.com/edna-validation-scale/validated-assays/validated-assays/>

Tulokset

Kaikki näytteet olivat molempien näytteenottoaikkojen suhteen yksiselitteisesti negatiiviset. qPCR-kuvaajan 3 nousevaa käyrää ovat positiiviset kontrollit laimennoksilla 1:10, 1:100 sekä 1:1000. Ne toimivat odotusten mukaisesti, joten kenttänäytteiden ollessa negatiivisia, voimme todeta, että filttäreissä ei ollut raakun eDNA:ta.



Johtopäätökset & Biologin lausunto (Pekka Heiskanen)

Tutkittava kohde ja tulokset olivat eDNA-selvityksen perusteella selkeästi negatiivisia, eikä tuloksissa ilmennyt teknisiä epävarmuustekijöitä.

Raakulle optimaalisin ajankohta eDNA-selvityksissä sijoittuu loppukesältä alkusyksyyn. Paras aika näytteenoton suorittamiselle on silloin, kun raakun DNA:ta on vedessä mahdollisimman paljon ja taas toisaalta, kun veden tilavuus on mahdollisimman pieni. Eli näytteenotto on yleisesti ottaen paras suorittaa aikana, jolloin globidium-toukkien määrä on runsas, eikä virtavedet tulvi. Tässä selvityksessä näytteet otettiin 24.10.2024, joka on raakulle optimaalisen näytteenottoajan ulkopuolella. Raakun eDNA:n havaitsemisen kannalta näytteenoton päivämäärän huolellinen valinta parantaa tulosten luotettavuutta ja vähentää epävarmuustekijöitä edellämainituista syistä johtuen.

Tämän selvityksen perusteella totean, että jos tutkitussa vedessä elää raakkuja, on ne mahdollista havaita eDNA-menetelmillä, mutta valittu näytteenottoajankohta lisää tulosten epävarmuutta.

Lähteet

(Takahashi et al., 2023) <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162322>

(Bruce et al., 2021) <https://doi.org/10.3897/ab.e68634>

(Wacker et al., 2019) <https://doi.org/10.1002/edn3.10>

Yhteystiedot

Projektivastaava:

Pekka Heiskanen

Sähköposti: pekka.heiskanen@springdna.com

Puh. +358 44 366 6560

Toimitusjohtaja:

Riku Kokkonen

Sähköposti: riku.kokkonen@springdna.com

Puh. +358 400 757 862

Web. www.springdna.com

RKO Holdings Oy / SpringDNA