

Pro gradu -tutkielma

**Joki- ja täplärapujen esiintymisen havainnointi eri
pyynti- ja näytteenottomenetelmillä**

Emmi Ventelä



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Akvaattiset tieteet

22.04.2022

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Akvaattiset tieteet

Ventelä Emmi: Joki- ja täplärapujen esiintymisen havainnointi eri pyynti- ja näytteenottomenetelmillä
Pro gradu -tutkielma: 24 s.
Työn ohjaajat: Prof. Juha Karjalainen ja FT Timo Ruokonen
Tarkastajat: FT Timo Ruokonen ja Dos. Heikki Hämäläinen
Toukokuu 2022

Hakusanat: Hakusanat: eDNA, signal crayfish, noble crayfish, *Astacus astacus*, *Pasifastacus leniusculus*

Suomessa elää makeissa vesissä kolme rapulajia: luonnonvarainen laji jokirapu (*Astacus astacus*) sekä istutetut täplärapu (*Pacifastacus leniusculus*) ja kapeasaksirapu (*Pontastacus leptodactylus*). Rapuja pyydetään useimmiten erityyppisillä syötettävillä merroilla. Tässä tutkimuksessa arvioidaan joki- ja täplärapujen esiintymisen havainnointia perinteisten rapumertojen lisäksi uusilla ilman syöttiä pyytävillä kolopyydyksillä, visuaalisella havainnoinnilla sekä ympäristö-DNA-menetelmän (eDNA) avulla. eDNA-menetelmä on hyödyllinen erityisesti uhanalaisten ja hankalasti havainnoitavien lajien tutkimuksessa, sillä sen avulla on mahdollisuus saada tietoa ilman kohdelajin pyydystämistä. Perinteisiä rapumertoja pidettiin pyynnissä 24 tuntia kullakin kohteella, kun taas kolopyydykset olivat pyynnissä 2 viikkoa, jotta ravut ehtivät tottua niihin. Visuaalinen havainnointi suoritettiin kahlaamalla tai tarkastelemalla veneestä rapuja silmämääräisesti ja vesikiikarin avulla. eDNA-näytteenotto suoritettiin siihen suunnitellulla järjestelmällä pumpaamalla 5 L vettä suodattimen läpi. eDNA-analysointi tehtiin laboratoriossa qPCR-analyysin avulla. Lisäksi kohdevesistä otettiin vesinäytteitä tukemaan tuloksia. Perinteisillä rapumerroilla ja eDNA-menetelmällä saatiin suurimmilta osin yhteneviä tuloksia ja nämä menetelmät todettiin toimiviksi havainnointimenetelmiksi. eDNA:n todettiin olevan kehityskelpoinen menetelmä kertomaan, onko vesistössä tiettyä rapulajia. Kolopyydykset eivät toimineet toivotulla tavalla, sillä niihin meni vain kahdessa paikassa vain yksittäisiä rapuja. Visuaalinen havainnointi osoittautui huonoksi havainnointimenetelmäksi etenkin syvillä ja tummavetisillä kohteilla. Kumpikaan näistä menetelmistä ei siis osoittautunut luotettavaksi havainnointimenetelmäksi.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science
Department of Biological and Environmental Science
Aquatic sciences

Ventelä Emmi: Observation of the noble crayfish and signal crayfish by
different capture and sampling methods
MSc thesis: 24 p.
Supervisors: Prof. Juha Karjalainen and FT Timo Ruokonen
Inspectors: FT Timo Ruokonen and Dos. Heikki Hämäläinen
May 2022

In Finland, three species of crayfish live in freshwater: noble crayfish (*Astacus astacus*), introduced signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) and narrow-clawed crayfish (*Pontastacus leptodactylus*). Crayfish are most often caught with different types of traps. This study evaluates the detection of noble and signal crayfish with new non-baited tube traps, visual detection, and environmental-DNA (eDNA) in addition to traditional traps in lakes and rivers. The eDNA method is particularly useful in the study of endangered and difficult-to-detect species, as it provides access to information without capturing the target species. Traditional traps were kept for 24 hours in each watersystem, while tube traps were kept for 2 weeks in order to allow the crayfish to get used to them. Visual observation was performed by wading or viewing crayfish from the boat visually and using a water binocular. The eDNA sampling was performed with a system designed for it, by pumping 5 L of water through a filter. The eDNA analysis was performed in the laboratory using qPCR-analysis. In addition, water samples were taken from the target waters to support the results. Traditional traps and the eDNA-method yielded largely consistent results and were found to be viable detection methods. eDNA was identified as a viable method that should be encouraged. The tube traps did not work as desired, as only in two places only few crayfish went into them. Visual observation proved to be a poor method of observation as well, especially in deep and dark water objects. Thus, neither of these methods proved to be a reliable detection method.

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO	1
2 AINEISTO JA MENETELMÄT	3
2.1 Kohdevesistöt	3
2.2 Rapujen havainnointi	4
2.2.1 Mertapyynti	4
2.2.2 Kolopyydykset	5
2.2.3 Visuaalinen havainnointi.....	6
2.2.4 eDNA-näytteenotto	7
2.2.5 eDNA-näytteiden analysointi	12
2.3 Vedenlaatu	12
3 TULOKSET	13
3.1 Mertapyynti, kolopyydykset, visuaalinen havainnointi ja eDNA	13
3.2 Vedenlaatu	16
4 TULOSTEN TARKASTELO	17
5 Johtopäätökset	21
KIITOKSET	22
KIRJALLISUUS	23

SANASTO JA LYHENTEET

LYHENTEET

eDNA ympäristö-DNA, environmental-DNA

1 JOHDANTO

Suomessa elää makeissa vesissä kolme rapulajia: luonnonvarainen alkuperäinen laji, jokirapu (*Astacus astacus*) sekä istutusten kautta levinnyt vieraslaji, täplärapu (*Pacifastacus leniusculus*). Lisäksi Kaakkois-Suomessa on tavattu harvakseltaan kapeasaksirapua (*Pontastacus leptodactylus*), joka on myös istutettu vieraslaji.

Alun perin täplärapu istutettiin Suomen vesiin korvaamaan rapuruton tuhoamia jokirapukantoja 1960-luvulla (Ruokonen ym. 2018). Jokirapu on Suomen vesistöjen alkuperäinen rapulaji ja se on luokiteltu Suomen lajien uhanalaisuusraportissa erittäin uhanalaiseksi (Hyvärinen ym. 2019). Jokirapujen kannat ovat huvenneet huomattavasti täpläravun kantaman rapuruton seurauksena (Erkamo ym. 2019). Tästä syystä rapukantojen seuranta on tärkeää ja siihen tarvitaan tehokkaita menetelmiä.

Rapuja pyydetään useimmiten erityyppisillä syötittävillä merroilla. Uutena pyydysmallina on ilman syöttiä pyytävä kolopyydys. Sen ideana on, että ravut hakeutuvat piiloon pyydyksen erikokoisiin putkiin. Kolopyydysmallia on testattu Iso-Britanniassa (Green ym. 2018), mutta Suomen vesistöissä näistä ei ole kokemusta.

eDNA-menetelmä on hyödyllinen erityisesti uhanalaisten ja hankalasti havainnoitavien lajien tutkimuksessa (Rees 2014, Turner ym. 2015, Goldberg ym. 2014), sillä sen avulla on mahdollisuus saada tietoa ilman kohdelajin pyydystämistä (Pawlowski ym. 2020). Vesieläinten eDNA:ta tutkitaan vesinäytteistä, jotka analysoidaan laboratoriossa DNA-eristysmenetelmillä. Lajikohtaisilla alukkeilla saadaan selville, onko näytteessä kohdelajin DNA:ta ja tämän avulla voidaan selvittää joki- ja täplärapujen esiintyvyys tutkittavassa vesistössä (Rees 2014). Aiemmin eDNA-menetelmää on käytetty vieraslajien sekä taudinaiheuttajien, esimerkiksi rapuruton, tunnistamisessa (Harper 2018, Strand ym. 2019, Jerde ym. 2011).

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli verrata pyynti- ja havainnointimenetelmiä toisiinsa ja saada tietoa tehokkaimmista rapujen tutkimusmenetelmistä ja niiden vertailukelpoisuudesta. Tutkimuksen pyyntimenetelmät olivat perinteinen syötetty rapumerta (Evo-merta), joka on suosittu erityisesti Pohjoismaissa (Ulikowski ym. 2017) ja syötättämätön passiivinen kolopyydys. Yhtenä havainnointimenetelmänä käytettiin eDNA-näytteenottoa, jota on käytetty laajasti useille rapulajeille monessa eri maassa (Strand ym. 2019). Havainnointia tehtiin lisäksi myös vesikiikarin avulla kahlaamalla.

Rapujen pyynnin ja havainnoinnin lisäksi kohteista otettiin veden laatuäytteitä tukemaan tuloksia ja selittämään mahdollisia saaliseroja. Tutkimusten mukaan happamuuden on todettu vaikuttavan rapujen lisääntymiseen ja hidastavan niiden kasvua (Beaune 2018) Lisäksi DNA:n saannin on todettu olevan parempaa happamissa kuin emäksisissä olosuhteissa (Tsuji ym. 2016). Humuspitoisuuden on myös todettu vaikuttavan PCR-reaktioihin ja estävän niissä tapahtuvaa DNA:n monistumista (Stoeckle ym. 2017). Myös korkeiden leväpitoisuuksien on todettu aiheuttavat samankaltaisia häiriöitä PCR-reaktioissa ja haittaavaan eDNA:n havaittavuutta (Stoeckle ym. 2017)

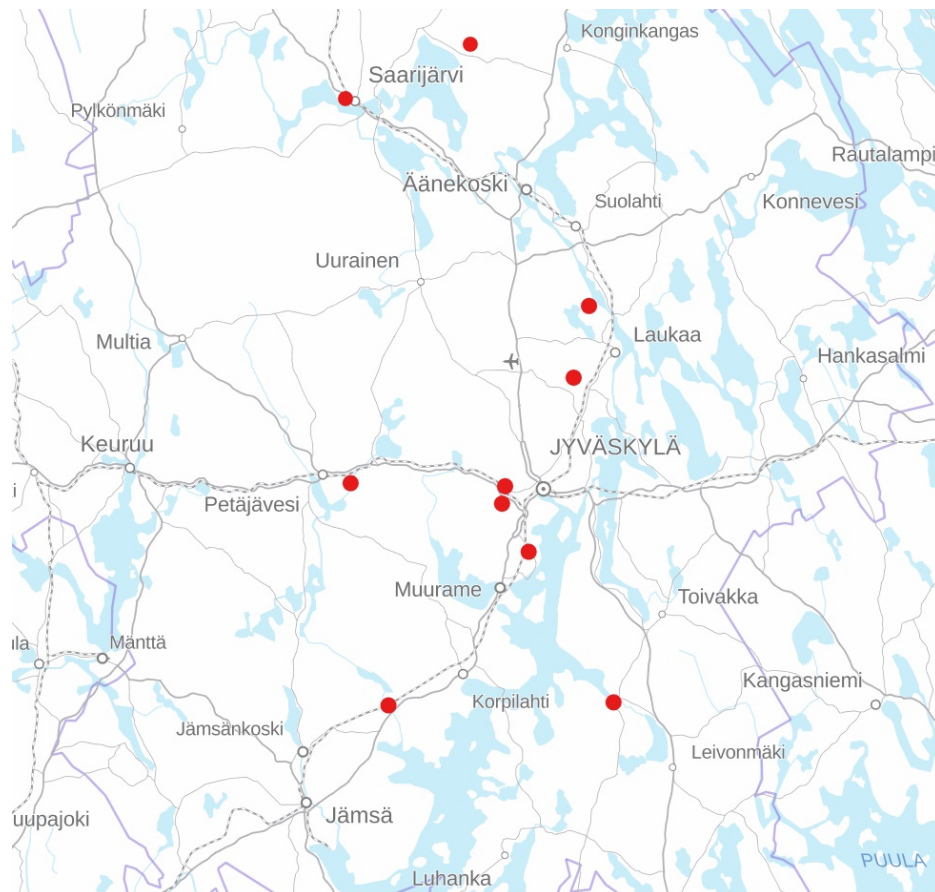
Tutkimuskysymyksenä oli ovatko pyynti- ja havainnointimenetelmät verrannollisia keskenään ja miten saadut tulokset eroavat toisistaan. Hypotesina oli, että merroilla ja kolopyydyksillä saadaan yhteneviä tuloksia. Visuaalisen havainnoinnin ja eDNA-menetelmän oletettiin tukevan muita menetelmiä. eDNA-menetelmän on todettu olevan tarkka, sillä se voi todentaa lajin esiintyvyyden jo pienestä määrästä DNA:ta, ja DNA-fragmentit voivat säilyä pitkäänkin (Ficetola ym. 2008, Dejean ym. 2011) ja näin ollen todentaa rapujen esiintymisen myös kohteilla, joissa raputiheys on alhainen eikä mertoihin kerry rapuja.

Tutkimus toteutettiin Pohjois-Päijänteellä ja sen lähialueilla ja kohdevesistöt valikoituivat aiempien ravustustietojen pohjalta.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Kohdevesistöt

Tutkimuksen kohdevesistöiksi valittiin 6 järveä sekä 6 virtavettä Keski-Suomesta. Järvikohteiksi valikoituivat Herajärvi, Järnätjärvi, Kolmisoppinen, Köhniönjärvi, Sääksjärvi ja Siikajärvi. Joki-/purokohteita olivat Haapajoki, Könkköjoki, Saajoki, Peltojoki, Peurunkajoki ja Köhniöpuro (Kuva 1). Jokaiselta kohteelta otettiin vesinäytteet, joista määritettiin sähkönjohtavuus (HI9635, Hanna Instruments, USA), happamuus (pH) (PHM220, Meterlab, Tanska) ja väri (Värikomparaattori Hellige) (Taulukko 1 ja 2). Kohteiden muut perustiedot, kuten pinta-ala (ha), rantaviivan pituus (km) ja keskisyvyys (m) haettiin Suomen ympäristökeskuksen Hertta-tietokannasta.



Kuva 1. Kohdevesistöt (Maanmittauslaitos, Karttapaikka, Taustakarttasarja 2022)

Taulukko 1. Järvikohteiden tiedot.

Järvi	Järvinumero	Pinta-ala (ha)	Rantaviiva (km)	Keskisyvyys (m)	pH	Sähkönjohtavuus	Väri
Siikajärvi	14.313.1.002	83,9	3,7	9,6	6,4	17,1	10
Kolmisoppinen	14.231.1.037	14,5	1,8	4,2	7,2	20,1	20
Herajärvi	14.614.1.004	46,3	3,7	8,1	7,3	21,4	25
Sääksjärvi	14.231.1.027	61,0	3,6	5,6	7,6	28,4	15
Köhniönjärvi	14.232.1.005	28,8	3,3	6,7	6,8	38,5	80
Järnätjärvi	14.237.1.001	17,3	3,1	-	6,6	10,7	125

Taulukko 2. Jokikohteiden tiedot.

Joki	Pituus (m)	Kaltevuus (%)	pH	Sähkönjohtavuus	Väri
Köhniönpuuro	1654	-	7,1	58,6	100
Peltojoki	4873	0,5	7,0	9,4	150
Könkköjoki	3104	0,6	6,5	11,7	60
Peurunkajoki	1663	1,0	6,8	16,1	25
Saajoki	7396	0,6	6,3	15,8	80
Haapajoki	1708	0,3	6,3	13,4	125

2.2 Rapujen havainnointi

2.2.1 Mertapyynti

Ravustukset aloitettiin heinäkuun lopulla 2020. Ravustus tapahtui syötitetyillä Evo-merroilla (Kuva 2), joissa syöttinä käytettiin pakastettuja särkikaloja. Merrat laitettiin rannan tuntumaan 1–3 metrin syvyyteen ja ne laskettiin järvikohteissa kymmenen merran jadoissa. Jokikohteissa merrat aseteltiin yksittäin mahdollisimman tasaisin välein joen uomaan. Merrat olivat pyynnissä 24 tuntia. Saaliiksi saaduilta ravuilta kirjattiin muistiin selkakilven pituus, sukupuoli sekä mahdolliset vauriot ja ruton merkit. Tämän jälkeen ravut vapautettiin takaisin pyyntivesistöön.

Ensin ravustettiin jokirapupaikat: Siikajärvi 10.8.2020, Järnätjärvi 6.8.2020 ja Kolmisoppinen 11.8.2020 sekä Haapajoki 27.7.2020 ja Saajoki 29.7.2020.

Jokirapukohteiden jälkeen siirryttiin kontrollivesistöihin eli vesistöihin, joissa ei aiemman tiedon mukaan ollut rapuja. Näitä olivat Köhniönjärvi 13.8.2020 ja Köhniönpuuro 13.8.2020. Viimeiseksi ravustettiin täplärapukohteet: Herajärvi 25.8.2020 ja Sääksjärvi 26.8.2020 sekä Könkköjoki 24.8.2020 ja Peurunkajoki 31.8.2020.



Kuva 2. Mertapyynnissä käytetyt Evo-merrat. Kuva Emmi Ventelä.

2.2.2 Kolopyydykset

Perinteisten rapumertojen lisäksi kuhunkin vesistöön laitettiin kymmenen ilman syöttiä pyytävää kolopyydystä, eli betoniharkkoon valettuja muoviputkia (Kuva 3). Kolopyydykset jätettiin paikalleen kahden viikon ajaksi ja haettiin tämän jälkeen pois. Myös tällä menetelmällä saaduilta ravuilta kirjattiin edellä mainitut ominaisuudet muistiin. Tämän jälkeen ravut vapautettiin takaisin vesistöön.



Kuva 3. Kolopyydys vedessä ja rannalla, Siikajärvi. Kuva Timo Ruokonen.

2.2.3 Visuaalinen havainnointi

Visuaalinen havainnointi suoritettiin pyydysten laskun yhteydessä paljaalla silmällä sekä vesikiikarin avulla (Kuva 4). Havainnoinnin aikana kahlattiin ja käänneltiin kiviä ja puita, tai vaihtoehtoisesti soudettiin kumiveneellä, noin 100 metrin matkalta rantavedessä ja havainnoitiin rapuja.



Kuva 4. Kuva vesikiikarin läpi, Peurunkajoki. Kuva Emmi Ventelä.

2.2.4 eDNA-näytteenotto

Ravustusten jälkeen kohteista otettiin eDNA-vesinäytteet. eDNA-näytteenotto suoritettiin tähän suunnitellulla järjestelmällä. Vesinäyte (5 L) pumpattiin peristalttipumpun (Masterflex L/S Easy-Load 3 77800-60 & Modular controller, Masterflex, CA, U.S.A, Kuva 5) avulla keräimestä, jona toimi painotettu muovirasia (Kuva 8), ohutta muoviletkaa (vahvikkeeton, halkaisija 5 mm) pitkin suodatinpidikkeeseen ja itse suodattimeen (In-Line Filter Holder, 47 mm XX4304700, Millipore, DE, kuva 7), johon analysoitava näyte, eli mahdolliset rapujen kudosis- ja solunäytteet, jäivät. Jokaisesta vesistöstä otettiin viisi näytettä ja näiden lisäksi, ennen jokaista näytettä nollanäyte puhtaasta vedestä, jotta pystyttiin toteamaan laitteiston olevan puhdas (Kuva 6). Näytteenotossa käytetty suodatinjärjestelmä kasattiin asettamalla lasikuitusuodatin desinfioituilla pinseteillä pidikkeeseensä ja kiristämällä pidikkeen puolikkaat yhteen ruuveilla. Keräimestä lähtevä tuloputki kiinnitettiin pidikkeen tulopäähän ja poistoputki toiseen puolikkaaseen, josta letku johdettiin mittakanisteriin.

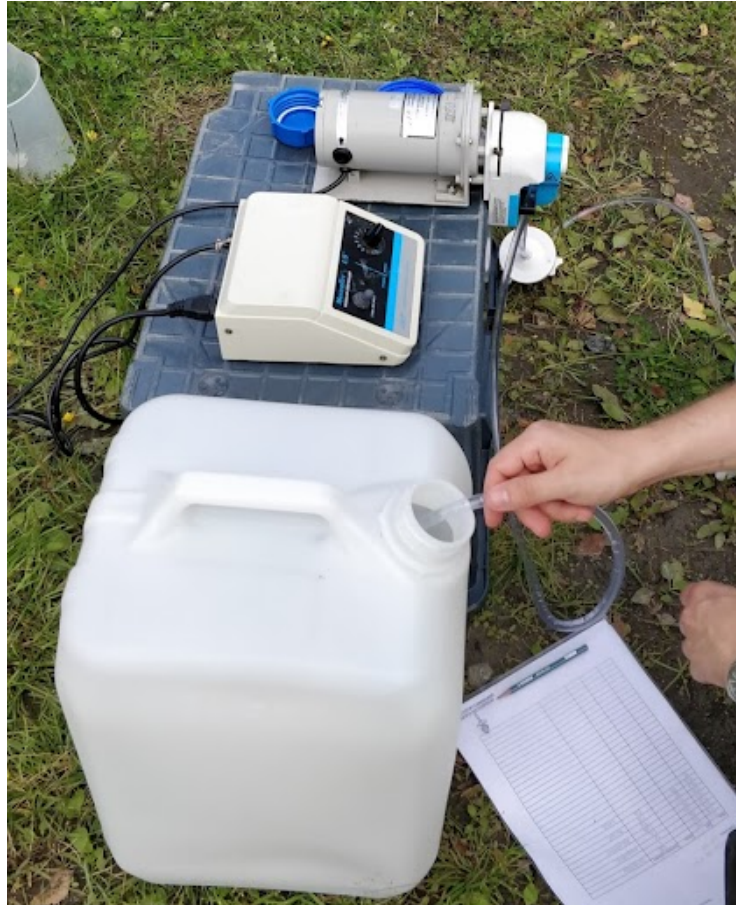
Aina ennen varsinaisia näytteitä otettiin nollanäyte, jossa suodatettiin 5 l puhdasta vettä järjestelmän läpi. Tämän jälkeen suodatinpidike purettiin, suodatin otettiin varovasti irti puhtailla pinseteillä (Kuva 9) ja se taiteltiin näyteputkeen (Kuva 10), joka laitettiin kylmälaukkuun jäiden sekaan (Kuva 11). Suodattimesta jääneet mahdolliset jäämät putsattiin huuhtomalla ultrapuhtaalla vedellä. Tämän jälkeen suodatinpidike koottiin uudestaan uudella suodattimella ja aloitettiin varsinainen näytteidenotto. Keräin heitettiin tai asetettiin sopivaan paikkaan noin 5–10 metrin päähän rannasta. Sen annettiin vajota hiljalleen pohjaan ja asettua hetken, jotta mahdollisimman vähän pohjamateriaalia tai roskia jäisi imuun. Keräimeen oli asetettu metalliverkko karkeaksi suodattimeksi, estämään isompia partikkeleita tukkimasta letkua. Kun pölähtänyt kiintoaines oli laskeutunut, pumpattiin hetken vettä tuloputken läpi, jotta voitiin tarkistaa, ettei veden mukana tule ylimääräistä kiintoainesta. Varsinaisten näytteiden otossa toimittiin samalla kaavalla kuin nollanäytteenkin kanssa. Mikäli suodatin tukkeutui eikä suodatettu vesimäärä ylittänyt 2 L, otettiin samalta näytteenottopaikalta myös toinen näyte puhtaalle suodattimelle. Näyteputkiin säilötyt suodattimet vietiin -20

°C pakastimeen, Jyväskylän yliopiston tiloihin, kunnes näytteet toimitettiin Kuopioon Itä-Suomen yliopiston laboratorioon analysoitavaksi.

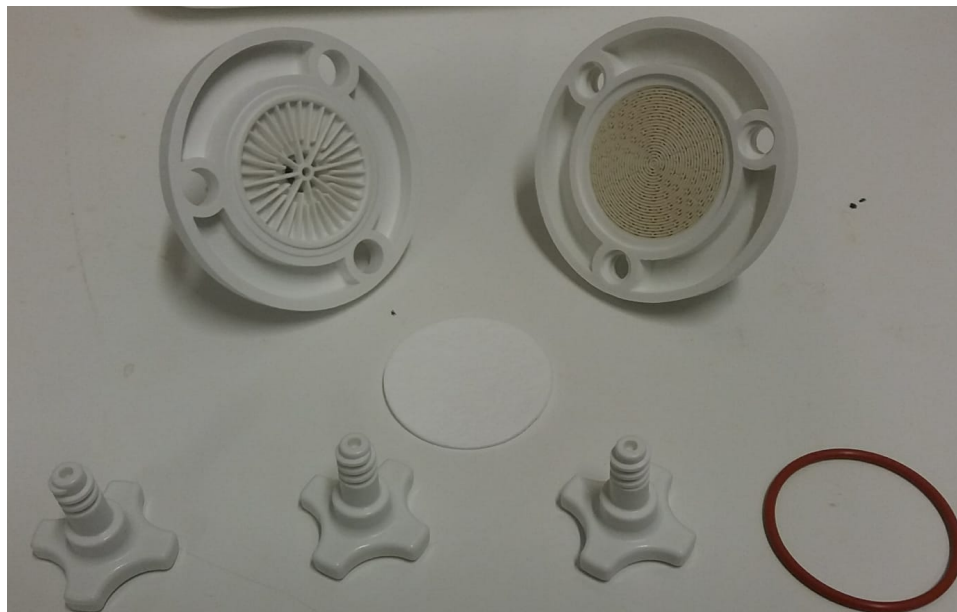
Näytteenotossa käytetyt välineet desinfioitiin upottamalla ja ajamalla niiden läpi kloriittiliuosta (Natriumhypokloriittiliuosta 10 % < CL < 20 % natriumhydroksidi) aina vesistön vaihtuessa rapuruttoriskin minimoimiseksi sekä puhtaan näytteen saamiseksi. Näytteenoton aikana käytettiin desinfioituja suojakäsineitä. Lisäksi jokaiselle näytteelle oli näytekohtaiset, desinfioidut välineet, jotka pakattiin omiin desinfioituihin ämpäreihinsä laboratoriossa. Näin varmistettiin, että jokainen rinnakkainen näyte on otettu puhtailla, yhtäläisillä välineillä.



Kuva 5. eDNA-näytteenoton pumppujärjestelmä (Masterflex L/S Easy-Load 3 77800-60 & Modular controller). Kuva Emmi Ventelä.



Kuva 6. Puhdasta vettä pumpattiin ensin järjestelmän läpi. Kuva Timo Ruokonen.



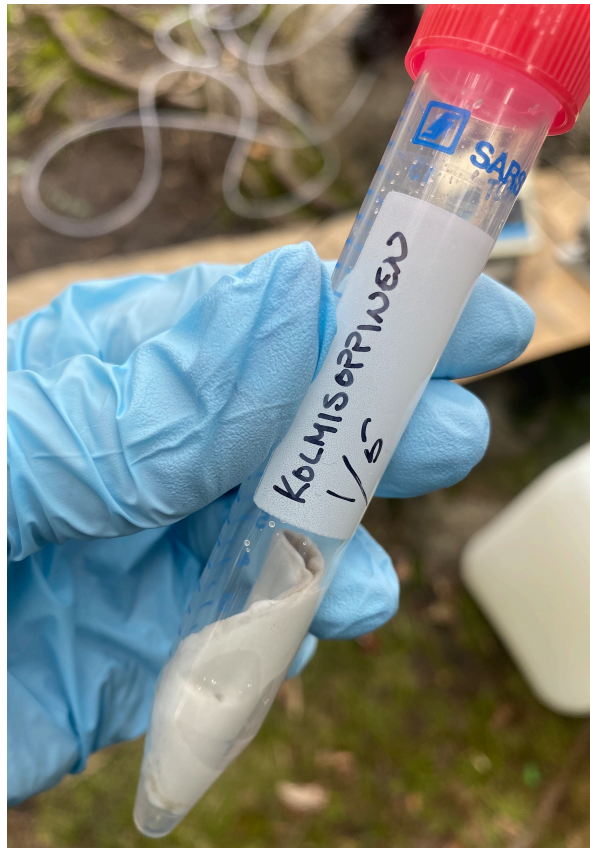
Kuva 7. eDNA-näytteenoton Millipore-suodatin. Kuva Mikko Mäkinen.



Kuva 8. eDNA-näytteenoton keräin. Kuva Timo Ruokonen.



Kuva 9. Valmis suodatin poistetaan varovasti pinsettien avulla. Kuva Timo Ruokonen.



Kuva 10. Suodatin taitellaan varovasti nimikoituun näyteputkeen. Kuva Emmi Ventelä.



Kuva 11. Näytteet kylmähauteessa. Kuva Emmi Ventelä.

2.2.5 eDNA-näytteiden analysointi

eDNA-näytteiden analysointi tapahtui Itä-Suomen yliopiston laboratoriossa Kuopiossa, Japo Jussilan ja Harri Kokon toimesta. eDNA-analysointi tehtiin qPCR-menetelmällä, jossa DNA:n nukleiinihappoja monistetaan polymeraasiketjureaktion avulla (Rahikka 2022). Analyysi on monivaiheinen prosessi, jossa suodattimet ensin hienonnettiin, ja tämän jälkeen DNA eristettiin näytteestä ja puhdistettiin (Mäkinen ym. 2021). Aiempien DNA-eristysten avulla valmistettiin tutkimuksessa tarvittavat positiivistandardit täpläravulle, jokiravulle sekä rapurutolle. qPCR-analyysiin käytettiin LightCycler 400-laitteistoa, joka takasi tuloksille hyvän luotettavuuden ja mahdollisuuden tarkastella VIC-tunnisteita (Mäkinen ym. 2021).

2.3 Vedenlaatu

Jokaisesta kohteesta otettiin vesinäytteet lasipulloihin (Kuva 12) ja niitä säilytettiin tarvittaessa väliaikaisesti kylmiössä. Näytteiden annettiin tasaantua huoneen lämpöisiksi ennen mittausten tekemistä, jotta tulokset olisivat verrannollisia keskenään. Veden happamuus mitattiin pH-mittarilla (PHM220 lab pH Meter, MeterLab) ja sähkönjohtavuus mitattiin sähkönjohtavuusmittarilla (HI 9635 multirange conductivity/TDS meter, Hanna Instruments, U.S.A). Veden väriä tarkasteltiin komparaattorimenetelmällä (Hellige). Veden laatusäilytysnäytteiden suhdetta rapujen yksikkösaaliiseen analysoitiin IBM SPSS Statistics -ohjelman avulla, käyttäen Spearmanin korrelaatioanalyysiä.



Kuva 12. Vedenlaatu­näytteet. Kuva Emmi Ventelä.

3 TULOKSET

3.1 Mertapyynti, kolopyydykset, visuaalinen havainnointi ja eDNA

Rapuja havaittiin mertapyyntin avulla kahdeksasta kohteesta (Taulukko 3). Köhniönpurolla, Köhniönjärvellä, Peltojoella, Siikajärvellä ja Kolmissoppisella saaliiksi saatiin jokirapuja. Könkköjoella, Peurunkajoella ja Sääksjärvellä saaliiksi saatiin täplärapuja. Herajärvellä saaliiksi saatiin molempia lajeja. Ravuttomiksi kohteiksi mertapyyntin perusteella osoittautuivat Saajoki, Järnätjärvi ja Haapajoki. Millään kohteilla ei havaittu saaliiksi saaduissa ravuissa ulkoisia rapuruton merkkejä.

Kolopyydyksillä rapuja havaittiin vain kahdesta kohteesta, Siikajärveltä sekä Peurunkajoelta (Taulukko 3). Koska vesikiikareiden käyttö suurimmalla osalla

kohteista osoittautui varsin haasteelliseksi, myös vesikiikareilla havaittiin rapuja vain kahdesta kohteesta, Peurunkajoelta ja Könkköjoelta (Taulukko 3).

eDNA-menetelmällä rapuja havaittiin kaikilta paitsi kahdelta kohteelta, Järnätjärveltä ja Sääksjärveltä. Jokirapujen DNA:ta löytyi Peltojoelta, Haapajoelta, Saajoelta, Köhniönpurolta, Köhniönjärveltä, Siikajärveltä, Kolmisoppiselta ja Herajärveltä. Täplärapujen DNA:ta löytyi Könkköjoelta ja Peurunkajoelta. Lisäksi eDNA-näytteistä havaittiin myös rapuruttoja neljältä kohteelta, Köhniönpurolta, Köhniönjärveltä, Sääksjärveltä ja Peurunkajoelta. Näistä Köhniönpuuro ja Köhniönjärvi ovat jokirapukohteita (Taulukko 4)

Taulukko 3. Kohteiden rapusaalis- ja havaintomäärät. TR = täplärapu, JR = jokirapu, r = rutto. Rapujen määrä on laskettu jakamalla saaliiksi saatujen rapujen kokonaismäärä (Herajärvellä molemmat lajit yhteen) pyytävien mertojen tai kolopyydysten määrällä per yö. eDNA:n kooditus vastaa vesinäytteestä havaittua lajileimaa sekä rapuruton leimaa. Visuaalinen havainnointi on esitetty kyllä / ei havaintojen perusteella. * = Paikallisen ammattiravustajan antama arvio rapukannasta.

Kohde	Laji	Rapuja/merta/yö	Rapuja/kolo/2vk	eDNA	Visuaalinen havainnointi
Haapajoki	-	0	0	JR	Ei
Saajoki	-	0	0	JR	Ei
Köhniönpuuro	JR	0,04	0	JR/r	Ei
Könkköjoki	TR	2,6	0	TR	Kyllä
Peurunkajoki	TR	3,7	0,4	TR/r	Kyllä
Peltojoki	JR	6*	-	JR	-
Järnätjärvi	-	0	0	-	Ei
Köhniönjärvi	JR	0,2	0	JR/r	Ei
Siikajärvi	JR	0,4	0,1	JR	Ei
Kolmisoppinen	JR	0,7	0	JR	Ei
Herajärvi	JR/TR	3,3	0	JR	Ei
Sääksjärvi	TR	0,2	0	r	Ei

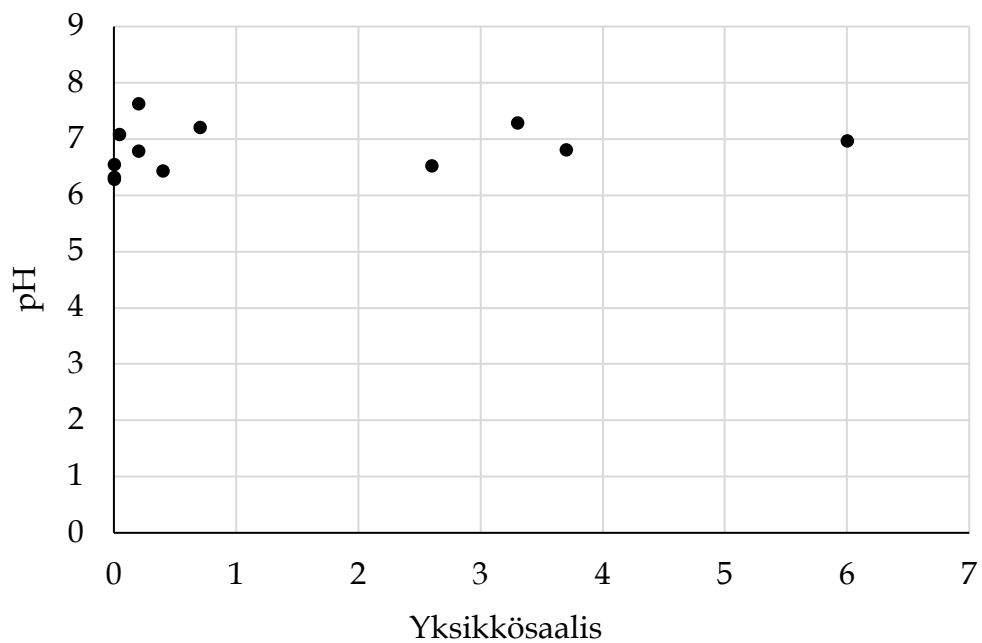
Taulukko 4. Kohteiden eDNA-analyysin tulokset. Taulukossa on ilmoitettu, monestako vesinäytteestä havaittiin jokiravun, täpläravun tai rapuruton leima, suhteessa tutkittujen näytteiden kokonaismäärään. Näytteiden määrät vaihtelevat kohteittain, sillä joistain kohteilta suodatinnäytteitä kerättiin useampi, jos ensimmäisen suodatuksen määrä oli alle 2 L. e/o tarkoittaa, ettei näytteistä saatu luotettavaa tulosta. Yksikkösaalis kuvaa rapujen määrää jaettuna pyytävien

mertojen määrällä, lajikohtaisesti. * = Paikallisen ravustajan antama arvio rapukannasta.

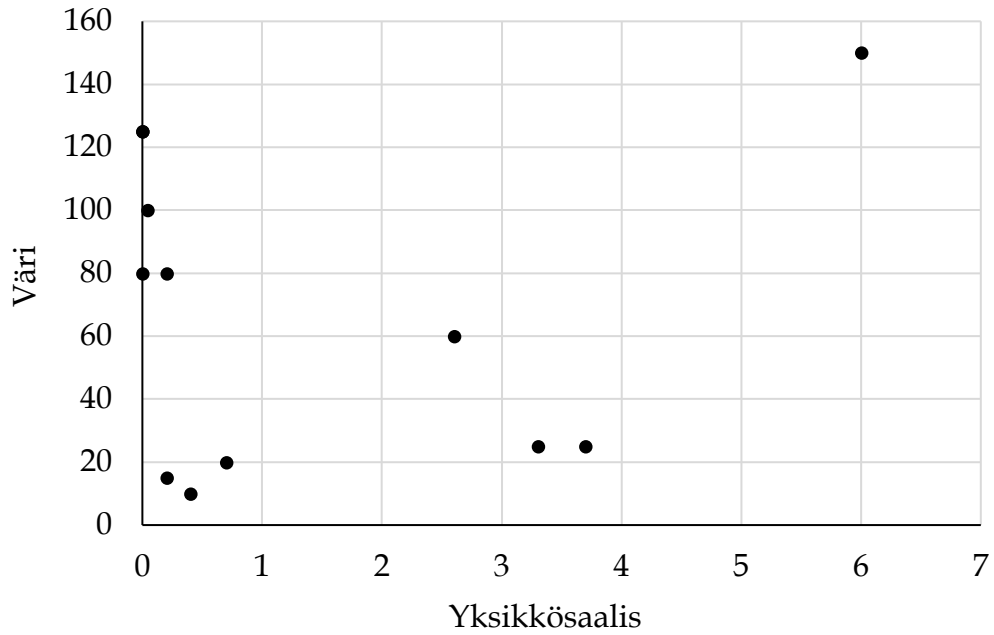
Vesistö	Laji	qPCR	Yksikkösaalis merroilla
Peltojoki	JR	5/6	6*
	TR	0/6	0
Köhniönpuuro	rapurutto	0/6	
	JR	2/5	0,04
	TR	0/4	0
Haapajoki	rapurutto	1/4	
	JR	7/7	0
	TR	0/7	0
Saajoki	rapurutto	0/7	
	JR	2/7	0
	TR	0/5	0
Peurunkajoki	rapurutto	0/5	
	JR	e/o	0
	TR	2/5	3,7
Könkköjoki	rapurutto	4/5	
	JR	e/o	0
	TR	3/5	2,6
Köhniönjärvi	rapurutto	0/5	
	JR	3/5	0,2
	TR	0/5	0
Siikajärvi	rapurutto	1/5	
	JR	6/6	0,4
	TR	0/6	0
Kolmisoppinen	rapurutto	0/6	
	JR	6/6	0,7
	TR	0/6	0
Herajärvi	rapurutto	0/6	
	JR	4/5	2,9
	TR	0/5	0,5
Sääksjärvi	rapurutto	0/5	
	JR	e/o	0
	TR	0/6	0,2
Järnätjärvi	rapurutto	1/6	
	JR	0/10	0
	TR	e/o	0
	rapurutto	0/10	

3.2 Vedenlaatu

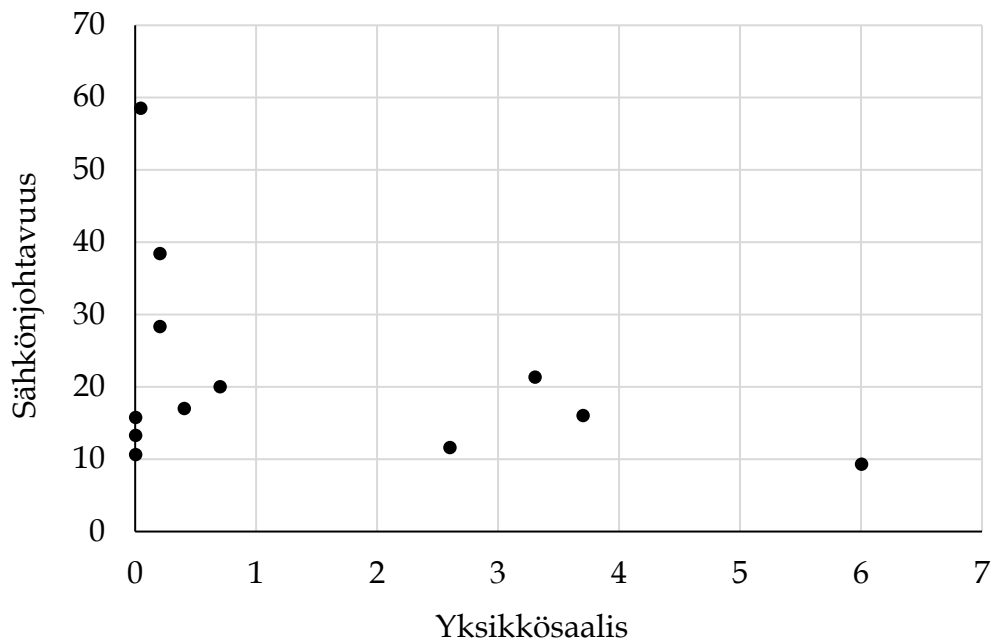
Veden happamuuden (pH) ja rapujen mertayksikkösaaliin välillä ei havaittu merkitsevää riippuvuutta ($r_s = 0,452$, $p = 0,141$) (Kuva 13). Kuten ei myöskään veden värin ja rapujen mertayksikkösaaliin ($r_s = -0,271$, $p = 0,394$) (Kuva 14) eikä sähkönjohtavuuden ja rapujen mertayksikkösaaliin välillä ($r_s = -0,95$, $p = 0,768$) (Kuva 15).



Kuva 13. Veden pH ja rapujen yksikkösaaliin välinen korrelaatio.



Kuva 14. Veden värin ja rapujen yksikkösaaliin välinen korrelaatio.



Kuva 15. Veden sähkönjohtavuuden ja rapujen yksikkösaaliin välinen korrelaatio.

4 TULOSTEN TARKASTELU

Rapujen mertapyynti ja eDNA-näytteenotto tuottivat suurelta osin samankaltaisia tuloksia. Kaikilta muilta kohteilta mertapyynnin ja eDNA-näytteiden tulokset

olivat yhteneviä, paitsi Haapajoelta, Saajoelta, Sääksjärveltä ja Herajärveltä. Saajoelta ja Haapajoelta ei saatu merta- tai kolopyydyksillä yhtään rapua, mutta eDNA-näytteiden mukaan vesistöissä esiintyi jokirapuja. Kanta on mahdollisesti saattanut olla niin pieni, ettei rapuja ole osunut mertoihin tai ravut ovat voineet olla pieniä ja ovat päässeet pois merroista. On myös mahdollista, että pohjasta on noussut hautautunutta DNA:ta, joka on näkynyt näytteissä ja kanta on jo aiemmin hävinnyt esimerkiksi rapuruton seurauksena. DNA voi absorboitua sedimenttiin, jolloin se säilyy paljon kauemmin kuin veteen liuennut DNA (Goldberg ym. 2015, Turner ym. 2015). Tämän on todettu viittaavan siihen, että absorboitunut DNA voi suuren virtauksen tai häiriön tuloksena liueta takaisin veteen jopa 6 kuukautta myöhemmin. Tämä voi aiheuttaa väärän positiivisen tuloksen lajien esiintymisen suhteen, minkä vuoksi pohjalle laskeutuneen sedimentin joutumista näytteeseen olisi syytä välttää näytteenotossa (Goldberg ym. 2015, Turner ym. 2015). DNA-fragmenttien pysyvyyden on epäilty kuitenkin olevan makeissa vesissä alle kuukauden (Dejean ym. 2011). Sen sijaan eDNA:n on todettu voivan kulkeutua jopa 9–12 km alavirtaan siitä paikasta, jossa populaatio esiintyy (Deiner ja Altermatt 2014). Ennusteiden mukaan etäisyys voisi olla jopa 15–50 km, ennen kuin eDNA:n havaitseminen laskee alle 5 %:n (Deiner ym. 2014). Saajoella ja Haapajoella jokiravun DNA:ta havaittiin useammassa näytteessä eikä kummassakaan kohteessa havaittu rapuruttoa, joten on todennäköistä, että kanta on vain pieni näissä kahdessa kohteessa tai sitten DNA:ta on kulkeutunut ylempää joista näytteenottopaikoille.

Täplärapua ei havaittu eDNA-määrityksessä Herajärvestä eikä Sääksjärvestä. Sääksjärvellä täplärapukanta oli mertapyynnin perusteella hyvin pieni ja ravut tuntuivat oleskelevan syvemmissä vesissä kuin mistä eDNA-vesinäytteet pystyttiin ottamaan. Herajärvellä täplärapujen kanta oli mertapyynnin perusteella pienempi kuin jokirapujen, ja lajit tuntuivat olevan alueellisesti keskittyneitä. Täpläravut elivät tälläkin järvellä huomattavasti syvemässä kuin jokiravut. Vain yksi eDNA-näyte otettiin alueelta, josta merroilla havaittiin täplärapuja, mikä voi selittää, ettei niitä havaittu eDNA-näytteissä. Tutkittavan taksonin DNA:n leviämiseen vaikuttaa kyseisen lajin tiheys alueella, lisäksi myös kyseisen taksonin biologia ja fysiologia (Pawlowski ym. 2020). Kalat ja sammakkoeläimet vapauttavat tiettävästi runsaasti

DNA:ta ympäristöönsä, kun taas niveljalkaiset, näin ollen myös ravut, vapauttavat paljon vähemmän DNA:ta. Tämän epäillään johtuvan äyriäisten ulkoisesta tukirangasta (Pawlowski ym. 2020).

Tutkimuksessa käytetty kolopyydys ei tuottanut luotettavia tuloksia rapujen havainnoinnissa, verrattuna eDNA-menetelmään sekä perinteiseen mertapyyntiin. Menetelmää käytettiin Suomessa ensimmäistä kertaa, minkä vuoksi vastaavia aiempia tutkimustuloksia sen käytöstä ei ole. Kolopyydyksestä on käytetty Iso-Britanniassa yksittäisessä kokeessa hyvin tuloksin (Green ym. 2018). Täytyy kuitenkin ottaa huomioon vesistöjen mahdolliset eroavaisuudet tutkimuksissa. Vaikutti siltä, että kolopyydyksiin hakeutui eniten rapuja kohteessa, joissa kanta oli suuri. Ravuilla ei liene tarvetta vaihtaa suojakoloon, jos niistä ei ole pulaa. Esimerkiksi Peurunkajoella rapujen kanta on suuri ja niitä havaittiin kävelemässä pohjaa pitkin päiväsaikaan, joten suojapaikoista on varmasti enemmän kilpailua. Näin ollen kolopyydykset olivat tervetulleita uusia piilopaikkoja. Pienillä kannoilla on kuitenkin varmasti jo tarpeeksi elintilaa omassa ympäristössään, joten ravut eivät välttämättä koe tarvetta mennä uusiin koloihin. Kolopyydyksen suunnittelua täytyy myös parantaa, sillä tutkimuksessa huomattiin, että putket nousevat helposti pystyyn, jolloin ravut eivät pääse pyydykseen. Pyydykset olivat myös haastavia asettaa paikoilleen syvään veteen veneestä, sillä ne jäivät helposti pystyyn, betoniosan upotessa ensimmäisenä. Erityisesti tummissa järvissä, kuten Kolmisoppisella ja Järnätjärvellä, oli lähes mahdoton tietää varmaksi, päätyikö pyydys oikein päin pohjaan. Kahlaamalla kolopyydykset oli helpompi asettaa paikoilleen ja tarkistaa, että ne myös pysyivät kyljellään.

Visuaalisella havainnoinnilla havaittiin rapuja vain kahdesta kohteesta, joten se ei tuottanut luotettavia tuloksia suhteessa eDNA-menetelmään ja mertapyyntiin. Tutkimuksessa todettiin visuaalisen havainnoinnin olevan haasteellista erityisesti jyrkkäreunaisilla ja tummavetisillä kohteilla. Vesikiikarin käyttö veneestä ei ollut toimiva menetelmä. Kahlaaminen kiikarin kanssa, ja ilman, toimi hitaasti virtaavissa, matalissa joissa tai puroissa. Lisäksi rapuja havaittiin silmin vain kohteissa, joissa kanta oli runsas ja rapuja liikkui näkyvillä myös päivällä. Lisäksi

rapujen havainnointi silmin vaatii rapujen elinympäristön ja käyttäytymisen tuntemusta sekä jo harjaantunutta silmää.

Tutkimuksessa otettiin vesinäytteet tukemaan mahdollisia eroja tuloksissa. Vesi-arvot eivät kuitenkaan korreloineet rapujen määrän suhteen. Kohteiden vesi-arvot eivät myöskään eronneet suuresti toisistaan. Jos vesistöt olisivat eronneet suuresti vedenlaadultaan toisistaan, olisi rapujen esiintymisessä voinut olla merkittävämpiä eroja näiden suhteen. Erityisesti veden tumma väri vaikutti kuitenkin silmämääräiseen havainnointiin negatiivisesti, mutta rapujen mertayksikkösaaliiseen sillä ei ollut vaikutusta.

Happamuuden on todettu hidastavan rapujen kasvua ja vaikuttavan negatiivisesti niiden lisääntymiseen (Beaune ym. 2017). DNA säilyy paremmin tummemmissa, emäksisissä ja viileissä olosuhteissa (Pawlowski ym. 2020). DNA:n mittaaminen vesinäytteistä on erään tutkimuksen mukaan onnistunut happamammissa olosuhteissa paremmin kuin emäksisissä (Tsuji ym. 2016). Selkeästi paremmin tuloksia saatiin pH:ssa 5 kuin pH:ssa 9 (Tsuji ym. 2016). Omassa tutkimuksessani kaikkien kohteiden pH-arvot olivat lähellä 7. Matalin pH-arvo oli 6,3 ja se oli sekä Haapajoella että Saajoella. Haapajoen kaikista seitsemästä näytteestä löytyi DNA:ta. Saajoella DNA:ta löytyi vain kahdesta näytteestä seitsemästä, sieltä ei kuitenkaan löytynyt rapuja myöskään mertapyynnillä. Suurin arvo oli 7,6 Sääksjärvellä. Kyseisen järven näytteistä ei löytynyt lainkaan rapujen DNA:ta, vaikka täplärapuja saatiin merroilla. Muut kohteet asettuivat tähän välille ja niiden näytteistä löytyi vaihtelevasti rapujen DNA:ta.

Humuspitoisuuden on todettu vaikuttavan PCR-reaktioihin ja estävän jopa niissä tapahtuvaa DNA:n monistumista (Stoeckle ym. 2017). Humiinihapon on todettu estävän PCR-reaktion toiminnan jo pieninäkin pitoisuuksina (Stoeckle ym. 2017). Ei pystytä varmaksi sanomaan, miksi osan kohteiden eDNA-määritys epäonnistui, mutta esimerkiksi Järnätjärvellä humuspitoisuus oli hyvin korkea eikä tältä järveltä saatu luotettavaa tulosta täplärapukannasta. Peurunkajoella ja Sääksjärvellä vesi oli kuitenkin kirkasta, joten näissä tapauksissa epäonnistuneen eDNA-määrityksen syynä ei todennäköisesti ole humuksen aiheuttama haitta. Myös muiden veden

inhibiittorien on todettu vaikuttavan juuri PCR-reaktioihin. Esimerkiksi kalsiumyhdisteiden ja magnesiumin on todettu laskevan reaktion monistustehokkuutta (Stoeckle ym. 2017). Suuri levien määrä vedessä haittaa myös DNA:n havaittavuutta. On epäilty, että levät sisältävät aineita, jotka häiritsevät PCR-reaktioita, esimerkiksi happoja ja polysakkarideja (Stoeckle ym. 2017, Schrader ym. 2012). Kaiken kaikkiaan on tärkeää hankkia alueellisesti edustava vesinäyte, josta DNA määritetään. Lisäksi eDNA-näytteenottoa tulisi kehittää niin, että sillä saataisiin näytteitä myös syvemmiltä alueilta.

5 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimus osoittaa, että perinteinen mertapyynti sekä eDNA-menetelmä osoittautuivat luotettaviksi havainnointimenetelmiksi rapukantojen tutkimuksessa. Perinteinen mertapyynti on työläämpi havainnointimenetelmä, ainakin maastotöiden osalta, kuin eDNA-menetelmä. Mertapyynti vaatii usein suuren määrän mertoja ja ainakin kaksi pyyntivuorokautta. Lisäksi mertojen desinfiointi ja syötittäminen on aikaa vievää. Rapuruton leviämislle on myös suurempi riski mertapyyntissä, sillä merrat ovat haastavia saada täysin puhtaksi. Perinteisillä merroilla on kuitenkin mahdollista arvioida kohteen rapukannan kokoa sekä rapujen koko- ja sukupuolijakaumaa. Mertapyynti on siis oivallinen menetelmä, mikäli halutaan kohteen rapukannasta tarkempaa tietoa. eDNA-menetelmä on kenttätöiden osalta huomattavasti vähemmän työläs, mutta sillä saa vain kyllä-ei-tietoa tutkittavista kohteista. Sen avulla pystyy kuitenkin todentamaan samoilla näytteillä myös rapuruton. eDNA-menetelmä sopii kantojen karkeaan arviointiin. Lisäksi menetelmällä on mahdollista kerätä useita näytteitä päivässä ja sen avulla on helppoa kattaa laajakin vesialue. Koska tulokset olivat hyvin paikallisia, on selvää, että tutkittavan alueen paikkatuntemuksesta on hyötyä sopivien näytepaikkojen valinnassa. Myös eDNA-menetelmän laitteisto on puhdistettava huolellisesti, mutta puhdistus on kohtalaisen helppoa ja sen pystyy tarpeen tullen tekemään myös maastossa, jolloin samaa välineistöä voi käyttää heti

toisessa vesistössä. eDNA-menetelmän laboratorio-osuutta hiotaan vielä, jotta analyysi sujuisi vaivattomasti ja nopeasti sekä mahdollisimman tarkasti.

Tutkimuksessa käytettyä kolopyydystä ja visuaalista havainnointia ei todettu luotettaviksi havainnointimenetelmiksi, verrattuna perinteiseen mertapyyntiin tai eDNA-menetelmään, sillä niiden avulla havaittiin vain yksittäisiä rapuja. Nämä havainnointimenetelmät vaativat tietyn tyyppisiä vesistöjä sekä tarpeeksi runsaita rapukantoja toimiakseen toivotulla tavalla.

Tutkimuksen perusteella totean, että uusi eDNA-menetelmä on ehdottomasti mielenkiintoinen ja kehityskelpoinen menetelmä ja sitä kannattaa edistää. eDNA-menetelmää voisi myös käyttää rinnakkain perinteisen mertapyynnin kanssa laajempien tulosten saamiseksi, sekä tukemaan toisiaan tarpeen mukaan. Se on herättänyt kiinnostusta ulkomailla etenkin uhanalaisten harvalukuisten lajien ja vieraslajien kartoituksessa, eikä syyttä. eDNA-menetelmä on vasta melko uusi tulokas Suomessa, mutta LUKE ja SYKE ovat alkaneet kehittää sitä eteenpäin.

KIITOKSET

Suurin kiitos ohjaajilleni Juha Karjalaiselle sekä Timo Ruokoselle kaikesta avusta, neuvoista sekä kannustamisesta graduni aikana. Ja erityiskiitos Timolle, että pääsin mukaan tähän projektiin. Kiitos myös kenttätyöporukalle Rosanna Sjövikille sekä Mikko Mäkiselle. Lisäksi kiitos laboratorio-osuuden tehneille Japo Jussilalle ja Harri Kokolle. Kiitokset myös kaikista valmisteluista ja erityisesti kolopyydysten visioinnista Jonna Kuhalle, Juha Ahoselle ja Ahti Karusalmelle. Tutkimus tehtiin osana Maa- ja metsätalousministeriön rahoittamaa rapu-eDNA-hanketta.

KIRJALLISUUS

- Beaune D., Sellier Y, Luquet G. & Grandjean F. 2018. Freshwater acidification: an example of an endangered crayfish species sensitive to pH. *Hydrobiologia* 813: 41–50. doi:10.1007/s10750-018-3504-4
- Deiner K. & Altermatt F. 2014. Transport Distance of Invertebrate Environmental DNA in a Natural River. *PLoS ONE* 9(2). doi: 10.1371/journal.pone.0088786
- 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(8). doi: 10.1371/journal.pone.0023398
- Erkamo E., Lakka H-K. & Könönen K. 2019. Erittäin uhanalaiseksi luokiteltu jokirapu ja tunturivesien äyriäiset uhanalaisia [https://www.syke.fi/fi-FI/Ajankohtaista/Erittain_uhanalaiseksi_luokiteltu_jokira\(50501\)](https://www.syke.fi/fi-FI/Ajankohtaista/Erittain_uhanalaiseksi_luokiteltu_jokira(50501)) (Luettu 9.11.2020) Suomen ympäristökeskus
- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F & Taberlet, P. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* 4(4): 423–425. doi:10.1098/rsbl.2008.0118
- Goldberg C.S., Strickler K. M. & Pilliod D.S. 2015. Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation* 183: 1–3. doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.040
- Green N., Bentley M., Stebbing P., Andreou D., & Britton R. 2018. Trapping for invasive crayfish: comparisons of efficacy and selectivity of baited traps versus novel artificial refuge traps. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems* 419: 15–. doi:10.1051/kmae/2018007
- Harper K.J., Anucha N.P., Turnbull J.F., Bean C.W. & Leaver M.J. 2018. Searching for a signal: Environmental DNA (eDNA) for the detection of invasive signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852). *Management of Biological Invasions* 9 (2): 137–148. doi: 10.3391/mbi.2018.9.2.07
- Hyvärinen E., Juslén A., Kemppainen E., Uddström A. & Liukko U.-M. (toim.) 2019. Suomen lajien uhanalaisuus – Punainen kirja 2019. Ympäristöministeriö & Suomen ympäristökeskus. Helsinki. pp. 704
- Jerde C. L., Mahon A. R., Chadderton W. L. & Lodge D. M. 2011. “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters* 4(2): 150–157. doi:10.1111/j.1755-263X.2010.00158.x
- Mäkinen M., Jussila J., Sjövik R., Ventelä E., Kokko H., Pesonen A. & Ruokonen T. 2021. Jokirapujen ja täplärapujen esiintymisen selvittäminen eDNA-menetelmällä. Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksen tiedonantoja.1. Jyväskylän yliopisto. URN: ISBN:978-951-39-8929-3
- Pawlowski J., Apothéloz-Perret-Gentil L, Mächler E. & Altermatt F. 2020 Environmental DNA applications in biomonitoring and bioassessment of aquatic ecosystems. Federal Office for the Environment, Bern. Environmental Studies. no. 2010: pp. 71

- Rahikka M. 2022. *qPCR-laitteen käyttöönotto ja valikointi salmonellan kvalitatiiviseen määrittämiseen rypsi- ja rapsipuristeista*. Opinnäytetyö, Metropolia Ammattikorkeakoulu, Laboratorioanalytiikka, Helsinki
- Rees H.C., Maddison B.C., Middleditch D.J., Patmore J.R.M. & Gough K.C. 2014. The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology* 51 (5): 1450-1459. doi:10.1111/1365-2664.12306.
- Ruokonen T., Sjövik R., Erkamo E., Tulonen J., Ercoli F., Kokko H. & Jussila J. 2018. Introduced alien signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in Finland uncontrollable expansion despite numerous crayfisheries strategies. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems* 419 :27-. doi:10.1051/kmae/2018016
- Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L. & Johne R. 2012. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* 113 (5): 1014-1026. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
- Strand D. A., Johnsen S. I., Rusch J. C., Agersnap S., Larsen W. B., Knudsen S. W., Møller P. R. & Vrålstad T. 2019. Monitoring a Norwegian freshwater crayfish tragedy: eDNA snapshots of invasion, infection and extinction. *Journal of Applied Ecology* 56 (7): 1661-1673. doi:10.1111/1365-2664.13404
- Stoeckle B. C., Beggel S., Cerwenka A. F., Motivans E., Kuehn R, Geist J. & Doi H. 2017. A systematic approach to evaluate the influence of environmental conditions on eDNA detection success in aquatic ecosystems. *PLoS ONE* 12 (12). doi: 10.1371/journal.pone.0189119
- Tsuji S., Yamanaka H. & Minamoto T. 2016. Effects of water pH and proteinase K treatment on the yield of environmental DNA from water samples. *Limnology* 18: 1-7. doi:10.1007/s10201-016-0483-x
- Turner C.R., Uy K.L. & Everhart R.C. 2015 Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation* 183: 93-102. doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.017
- Ulikowski D., Chybowski L., Traczuk P. & Ulikowska E. 2017. A New Design of Crayfish Traps Reduces Escaping and Improves Opportunities for Long-Term Catching. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 17: 363-369. doi:10.4194/1303-2712-v17_2_15