

**Mikko Mäkinen¹, Japo Jussila², Rosanna Sjövik¹, Emmi Ventelä¹,
Harri Kokko², Aake Pesonen² & Timo J. Ruokonen³**

¹⁾ Bio- ja ympäristötieteiden laitos, Jyväskylän yliopisto
²⁾ Ympäristö- ja biotieteiden laitos, Itä-Suomen yliopisto,
³⁾ Luonnonvarakeskus, Jyväskylä

Jokirapujen ja täplärapujen esiintymisen selvittäminen eDNA-menetelmällä



Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksen tiedonantoja /
Proceedings of the Department of Biological and Environmental Science,
University of Jyväskylä

Toimittaja / Editor: Timo J. Marjomäki

Kansikuva / Cover photo: Timo Ruokonen

ISBN 978-951-39-8929-3

ISSN 2669-8986

Julkaisun pysyvä osoite / Permanent address to this publication:

<http://urn.fi/URN:ISBN:978-951-39-8929-3>

Jyväskylä 2021

ABSTRACT

Mikko Mäkinen, Japo Jussila, Rosanna Sjövik, Emmi Ventelä, Harri Kokko, Aake Pesonen & Timo J. Ruokonen

Monitoring of noble crayfish and signal crayfish using eDNA

Jyväskylä: University of Jyväskylä, 2021, 27 p. + 1 appendix.

Proceedings of the department of biological and environmental science, University of Jyväskylä 1/2021

ISSN 2669-8986

ISBN 978-951-39-8929-3

Locating and monitoring crayfish populations have traditionally been based on test trappings and citizen observations. Over the past years, methods based on the use of environmental DNA (eDNA) have evolved into a credible alternative alongside traditional methods. Using the molecular biological eDNA method it is possible to identify the presence of the target organisms in the sampled water bodies. The purpose of this study was to determine whether the eDNA method is suitable for identifying crayfish populations in Finnish waters and to compare the results obtained with traditional methods. In most study sites, test trappings and eDNA sampling produced the same result. However, from some of the sites the eDNA method indicated presence of crayfish, while trapping yielded no catch. In addition, the eDNA method detected also *Aphanomyces astaci* DNA in some sites. *A. astaci* is the causative agent of crayfish plague. Compared with trapping, eDNA sampling is lighter in a workload and there is a lower risk of spreading *A. astaci*. However, it should be noted that the population density estimate obtained by trapping cannot be reliably produced by eDNA. However, the use of eDNA combined with local knowledge is an effective method for observing crayfish populations.

Keywords: eDNA; noble crayfish; signal crayfish; trapping.

TIIVISTELMÄ

Mikko Mäkinen, Japo Jussila, Rosanna Sjövik, Emmi Ventelä, Harri Kokko, Aake Pesonen & Timo J. Ruokonen

Jokirapujen ja täplärapujen esiintymisen selvittäminen eDNA-menetelmällä

Jyväskylä: Jyväskylän yliopisto, 2021, 27 s. ja 1 liite.

Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksen tiedonantoja 1/2021

ISSN 2669-8986

ISBN 978-951-39-8929-3

Vaarantuneiden jokirapukantojen uhkana on vesistöihimme hyvin sopeutunut vieraslaji, täplärapu, ja sen kantama, erityisesti jokiravuille kohtalokas rapuruton muoto. Rapupopulaatioiden paikantaminen ja seuranta on perinteisesti perustunut paikallistietoon ja koeravustuksiin. Viime vuosien aikana ympäristö-DNA:n (eDNA) käyttöön perustuvat menetelmät ovat kehittyneet varteenotettavaksi vaihtoehdoksi perinteisten menetelmien rinnalle. eDNA-menetelmän avulla voidaan vesinäytteestä tunnistaa kohde-eliöt molekyylibiologisin menetelmin. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, soveltuuko eDNA-menetelmä käytettäväksi rapupopulaatioiden havainnoinnissa suomalaisissa vesistöissä ja verrata saatuja tuloksia perinteisiin havainnointimenetelmiin. Valtaosassa kohteista mertapyynti ja eDNA tuottivat havaittujen lajien osalta saman tuloksen. Osassa kohteita kuitenkin havaittiin eDNA-menetelmällä viitteitä joki- ja täplärapuista, mutta niitä ei saatu mertapyyntissä saaliiksi. Lisäksi osassa kohteista havaittiin myös rapurutto aiheuttavan *Aphanomyces astaci* -sienen DNA:ta. Mertapyyntiin verrattuna eDNA-menetelmä on työmäärältään kevyempi ja rapuruton leviämiskahva on menetelmää käytettäessä pienempi. On kuitenkin huomioitava, että mertapyyntillä saatavaa rapukannan tiheysarviota ei eDNA-menetelmän avulla kyettä luotettavasti tuottamaan. Kuitenkin eDNA-menetelmän käyttö yhdistettynä paikallistietämykseen on tehokas rapupopulaatioiden havainnointiin.

Hakusanat: eDNA, jokirapu, ravustus, täplärapu, ympäristö-DNA

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO.....	7
2	AINEISTO JA MENETELMÄT	9
	2.1 Kohdevesistöt.....	9
	2.2 Havainnointimenetelmät.....	10
	2.2.1 Koeravustus.....	10
	2.2.2 Kolopyydykset	11
	2.2.3 Visuaalinen havainnointi.....	12
	2.2.4 eDNA-näytteenotto	12
	2.2.5 Näytteenottovälineiden puhdistus ja rapuruton leviämisen estäminen.....	15
	2.2.6 Rapusaaliin käsittely	15
	2.3 eDNA-analyysi.....	16
	2.3.1 DNA:n eristäminen suodattimilta.....	16
	2.3.2 Alukkeet ja standardit.....	16
	2.3.3 qPCR-analyysi.....	17
3	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO	18
	3.1 Mertapyynti, kolopyydykset ja havainnointi	18
	3.2 eDNA-menetelmä.....	19
	3.2.1 Näytteenoton ja analyysien toimivuus.....	19
	3.2.2 Rapujen esiintyminen	19
	3.3 Menetelmien vertailu	22
	3.4 Suositukset ja jatkotoimet.....	23
	<i>KIITOKSET</i>	24
	<i>KIRJALLISUUS</i>	25

Liite 1

1 JOHDANTO

Suomen sisävesissä tavataan pääsääntöisesti kahta rapulajia, jokirapua (*Astacus astacus*) ja täplärapua (*Pacifastacus leniusculus*). Täplärapu on 1960-luvun lopulta alkaneiden istutusten myötä vesistöihin levitetty vieraslaji, joka tuotiin korvaamaan rapuruton heikentämiä ja hävittämiä jokirapukantoja (Erkamo ym. 2010). Täplärapu listattiin 2015 annetussa EU:n vieraslajiasetuksessa (EU 1143/2014) haitalliseksi vieraslajiksi, ja sen istuttaminen on kiellettyä vuoden 2016 alusta lähtien. Kansallisessa rapustrategiassa (Erkamo ym. 2019) vieraslajien osalta pääpainona on täplärapukantojen hallinta ja rapuruton leviämisen ehkäiseminen. Tavoitteena on myös suojella ja säilyttää olemassa olevat jokirapukannat ja palauttaa niitä suotuisille alueille istutuksin.

Jokirapu arvioitiin tuoreessa Suomen lajien uhanalaisuusraportissa, punainen kirja 2019, erittäin uhanalaiseksi (Väinölä ym. 2019) pääosin täpläravun ja sen mukanaan kantaman jokiravulle kohtalokkaan rapuruton melko hallitsemattoman leviämisen seurauksena (Ruokonen ym. 2018). Etelä-Suomessa jokirapukantojen tila on heikko, eikä tulevaisuus vaikuta siellä kovin valoisalta täplärapujen asuttaessa lähes kaikkia vesistöjä. Muualla Suomessa on kuitenkin vielä alueita, joissa esiintyy elinvoimaisia jokirapukantoja tai niiden palauttamiseen on vielä hyvät mahdollisuudet.

Suurimman uhan jokirapujen hyvinvoinnille aiheuttaa täplärapujen kantama rapurutto, jonka aiheuttaja on munasienien luokkaan kuuluva *Aphanomyces astaci*. Suomessa on aiemmin esiintynyt jokirapujen As-tyyppin rapuruttoa ja myöhemmin täplärapujen mukanaan tuomaa PsI-tyyppin rapuruttoa (Viljamaa-Dirks ym. 2012, Jussila ym. 2014). Täpläravun kantama PsI-tyyppin rapurutto aiheuttaa jokiravuihin voimakkaan ja nopeasti kuolemaan johtavan infektion (Jussila ym. 2013, Pursiainen & Viljamaa-Dirks 2014).

Rapupopulaatioiden paikantaminen perustuu perinteisesti rapuhavainnoista saatuihin ilmoituksiin ja koeravustuksiin. Koeravastukset vievät runsaasti resursseja, ja tiheydeltään harvan rapupopulaation havaitseminen on hyvin epävarmaa. Geenitekniikan kehittymisen myötä on syntynyt uusia menetelmiä tämän ongelman ratkaisemiseksi. Ympäristö-DNA:n (eDNA, environmental DNA) käyttö akvaattisten eliöiden seurannassa ja havaitsemisessa on viime vuosina kasvanut. Geneettistä materiaalia sisältävä eDNA voidaan eristää ympäristöstä otetusta näytteestä ilman, että itse kohde-eliö on mukana näytteessä (Ficetola ym. 2008, Rees ym. 2014, Thomsen ja Willerslev 2015). Monisoluisilla

eliöillä eDNA on peräisin mm. irronneista soluista, ulosteista, limasta, itiöistä tai muista ruumiin eritteistä (Thomsen ja Willerslev 2015). Näytteestä saatua geneettistä materiaalia monistetaan käyttämällä esimerkiksi kvantitatiivista polymeerasiketjureaktiota (qPCR), ja saatu DNA sekvensoidaan käyttäen apuna lajikohtaisia tai yleisiä alukkeita (Ficetola ym. 2008, Thomsen ja Willerslev 2015).

Aiemmissä tutkimuksissa eDNA:n on todettu olevan toimiva menetelmä vaarantuneiden rapupopulaatioiden suojelussa (Coward ym. 2018) ja vieraslajien havaitsemisessa jo invaasion alkuvaiheessa, jolloin yksilömäärät ovat alhaisia eikä rapuja välttämättä havaita perinteisillä pyyntimenetelmillä (Dougherty ym. 2016, Cai ym. 2017, Rusch ym. 2020). Menetelmän on todettu soveltuvan sekä joki- että järvi-kohteisiin (Larson ym. 2017, Harper ym. 2018, Ikeda ym. 2019). Rapupopulaatioiden havaitsemisen lisäksi eDNA:n avulla on kyetty selvittämään myös rapuruttoa aiheuttavan *A. astaci* -sienen esiintyminen (Robinson ym. 2018, Strand ym. 2019, Wittwer ym. 2019, Rusch ym. 2020). Veteen päätyvän geneettisen aineksen määrä vaihtelee vuodenaikojen välillä mm. rapuyksilöiden aktiivisuuden muutoksien, kuorenvaihdon tai naaraan kantaman hedelmöittyneen mädin vuoksi (Dunn ym. 2017, Rusch ym. 2020). Lisäksi eDNA:n soveltuvuutta populaation koon määrittämiseen on tutkittu, mutta saadut tulokset ovat olleet ristiriitaisia (Dougherty ym. 2016, Cai ym. 2017, Larson ym. 2017, Johnsen ym. 2020).

Jokirapukantojen heikon tilan parantamiseksi vaaditaan konkreettisia toimia olemassa olevien populaatioiden suojaamiseksi täpläravulta ja rapurutolta sekä palautusistutuksien kohdentamista sopiville alueille. Tehtävää on paljon, joten toimien suunnittelemiseksi tarvitaan kustannustehokkaita ja luotettavia menetelmiä vesistöjen raputilanteen selvittämiseksi. Jokirapujen palautusistutuksia suunniteltaessa tarvitaan luotettavaa tietoa rapuruton, täpläravun sekä jokiravun esiintymisestä. Lisäksi täpläravun leviämisen estämiseksi ja yksittäisten populaatioiden poistamiseksi tarvitaan ajantasaista tietoa levinneisyydestä. Tähän tehtävään eDNA-menetelmä vaikuttaakin potentiaaliselta työkalulta, jonka tuottaman tiedon avulla suomalaisten jokirapukantojen suojelutoimien suunnittelu ja täplärapukantojen hallinta voitaisiin nostaa paremmalle tasolle.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää eDNA-menetelmän soveltuvuutta rapukantojen ja rapuruton tunnistamiseen suomalaisista vesistöistä. Tutkimuksessa eDNA-menetelmällä saatuja havaintoja verrattiin perinteisillä menetelmillä saatuihin rapuhavaintoihin ja arvioitiin menetelmän sopivuutta seurantatyökaluksi niin paikallisen kuin valtakunnallisen tason toimijoille.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Kohdevesistöt

Tutkimuksen kohteiksi valittiin 6 virtavettä ja 6 järveä Keski-Suomen alueelta. Jokikohteita olivat Haapajoki, Könkköjoki, Köhniönpuuro, Saajoki, Peltojoki ja Peurunkajoki. Järvikohteita olivat Herajärvi, Järnätjärvi, Kolmisoppinen, Köhniönjärvi, Siikajärvi ja Sääksjärvi (Kuva 1). Kohteiden perustiedot noudettiin Suomen ympäristökeskuksen Herttatietokannasta. Jokaiselta kohteelta otettiin lisäksi vesinäytteet, joista määritettiin pH (PHM220, Meterlab, Tanska), sähköjohtokyky (HI9635, Hanna Instruments, USA) ja väri (Taulukot 1 ja 2).



KUVA 1 Tutkimuskohteiden sijainti Keski-Suomen alueella.

TAULUKKO 1 Tutkimusjärvien perustiedot (Hertta) ja vesinäytteistä mitatut suureet.

Järvet	Järvinumero	Pinta- ala (ha)	Ranta- viiva (km)	Keski- syvyys (m)	pH	Sähkön- johtavuus (μ S)	Väri- luku mg Pt l ⁻¹
Järnätjärvi	14.237.1.001	17,3	3,1	-	6,6	10,7	125
Herajärvi	14.614.1.004	46,3	3,7	8,1	7,3	21,4	25
Kolmisoppinen	14.231.1.037	14,5	1,8	4,2	7,2	20,1	20
Köhniönjärvi	14.232.1.005	28,8	3,3	6,7	6,8	38,5	80
Siikajärvi	14.313.1.002	83,9	3,7	9,6	6,4	17,1	10
Sääksjärvi	14.231.1.027	61,0	3,6	5,6	7,6	28,4	15

TAULUKKO 2 Tutkimusjokien ja purojen perustiedot (Hertta) ja vesinäytteistä mitatut suureet.

Virtavedet	Uomatunnus	Pituus (m)	Kaltevuus (%)	pH	Sähkön- joht. (μ S)	Väri
Haapajoki	1006012601453	1708	0,28	6,3	13,4	125
Köhniönpuuro	-	3900	1,97	7,1	58,6	100
Könkköjoki	1006012601144	3104	0,62	6,5	11,7	60
Peltojoki	1006012600583	4873	0,45	7,0	9,4	150
Peurunkajoki	1006012600875	1663	1,03	6,8	16,1	25
Saajoki	1006012601448	7396	0,55	6,3	15,8	80

Kohteet luokiteltiin aikaisempien tietojen pohjalta jokirapu- ja täplärapukohteiksi. Jokirapukohteita olivat Haapajoki, Järnätjärvi, Saajoki, Siikajärvi, Peltojoki ja Kolmisoppinen. Täplärapukohteita puolestaan Sääksjärvi, Könkköjoki ja Peurunkajoki. Herajärvessä tiedetään esiintyvän molempia lajeja. Ennakkotietojen perusteella Köhniönjärvi ja Köhniönpuuro luokiteltiin ravuttomiksi kohteiksi.

2.2 Havainnointimenetelmät

2.2.1 Koeravustus

Evo-merrat (Kuva 2) laskettiin järvikohteissa 10 pyydyksen jatoina rantaviivan myötäisesti rantaveteen (1–3 m). Jokikohteissa merrat laskettiin jatoina tai yksittäin. Mertojen syöttinä käytettiin pakastettua särkikalaa, lukuun ottamatta Peurunkajokea, jossa syöttinä käytettiin Laukaan kalankasvatuslaitokselta saatua lohta. Merrat olivat pyynnissä 24 tuntia, jonka jälkeen niiden saalis tarkastettiin.



KUVA 2 Syötityt Evo-merrat. Osassa jokikohteista merrat laskettiin yksittäisinä, jolloin ne merkittiin omilla kohoillaan. Kuva: Timo Ruukonen.

2.2.2 Kolopyydykset

Tutkimuksessa käytettyjen kolopyydysten malli pohjautui osittain Greenin ym. (2018) käyttämään pyydysmalliin. Kolopyydykset koostuivat erikokoisista viemäriputken pätkistä, jotka oli valettu sementtiin (Kuva 3). Pohjaan asetettuina pyydysten tarkoituksena on tarjota ravuille suojapaikkoja. Kolopyydykset asetettiin kohteissa muutaman metrin päähän rannasta. Pyydykset olivat vedessä yhtäjaksoisesti viikon, jonka jälkeen ne nostettiin ja rapusaalis tarkastettiin.



KUVA 3 Tutkimuksessa käytetty kolopyydysmalli. Putkien sisähalkaisijat olivat 56 mm, 36 mm ja 28 mm. Kuva: Timo Ruukonen.

2.2.3 Visuaalinen havainnointi

Pyydysten laskun ohessa havainnoitiin rantavesivyöhykkeen ominaisuuksia. Siinä pyrittiin löytämään merkkejä alueen ravuista, kuten pesäkoloja, kuoren kappaleita tai eläviä yksilöitä matalasta rantavedestä vesikiikaria apuna käyttäen (Kuva 4). Havainnoinnin aikana kahlattiin noin 100 m matka rantavedessä. Mikäli ranta oli vaikeakulkuista, liikuttiin vastaava matka kumiveneellä. Kahlaamisen yhteydessä pohjan kiviä ja puita käänneltiin, jotta voitiin löytää piiloutuneita rapuja.



KUVA 4 Rapujen havainnointia vesikiikarin avulla: pohjanäkymä vesikiikarin läpi. Kuva: Emmi Ventelä.

2.2.4 eDNA-näytteenotto

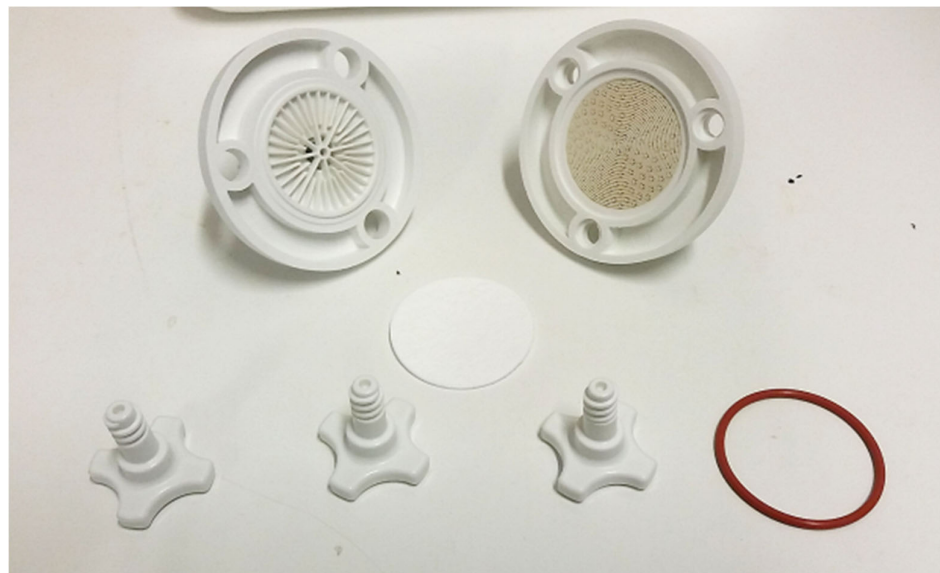
Näytteenottoon käytetty suodatuslaitteisto koostui sähkökäyttöisestä peristalttipumpusta ja sitä ohjaavasta taajuusmuuttajasta (Masterflex, Cole-Parmer, USA), tulo- ja poistoputkistosta (kirkas muoviletku 5,0/8,2 mm), tuloputken päähän kiinnitetystä painotetusta muovirasiasta (keräin), suodattimen pidikkeestä (Millipore, Merck KGaA, Saksa) ja halkaisijaltaan 47 mm lasikuitusuodattimesta, jonka suodatuskoko oli 2 μm (Millipore, Merck KGaA, Saksa) (Kuvat 5 ja 6). Peristalttipumpun ohella testattiin pumppausmenetelmää, jossa akkuporakonekäyttöinen rataspumppu imee veden suodattimen läpi. Porakonemenetelmässä pumpun tulo- ja poistoletkuina käytettiin kirkasta puutarhaletkua, joka kiinnitettiin pumppuun ja pidikkeeseen letkunkiristimillä (Kuva 7). Porakonepumppauksen perustuvassa suodatuksessa pumpun letkut täytettiin aluksi vedellä, jotta pumpun toiminta on sujuvaa.

13

Näytteenotossa käytettävät puhtaat välineet (letkut, keräin, suodatinpidike ja pinsetit) pakattiin näytekohtaisesti laboratorioissa erillisiin desinfioituihin ämpäreihin näytteenottoa varten. Näin jokainen rinnakkainen näyte (n = 5) voitiin ottaa aseptisesti esikäsitellyin välinein.



KUVA 5 Vasemmalla peristalttipumpun käyttöön perustuva näytteenottolaitteisto, oikealla vastaava akkuporakonepumpulla varustettu laitteisto. Kuvat: Timo Ruokonen.



KUVA 6 Näytteenotossa käytetty suodatin. Mekanismi koostuu pidikkeen tulopuolesta (ylhällä vasemmalla), suodattimesta (keskellä) ja tiheäsilmäisestä poistupuolesta (ylhällä oikealla). Puolikkaat kiinnitetään toisiinsa kuvan ruuveilla ja tiivistetään väliin asetettavalla O-renkaalla. Kuva: Mikko Mäkinen.

Ennen varsinaista näytettä jokaisella näytteenotto paikalla suodatettiin nollanäyte mukana tuotua porakaivovettä käyttäen, jotta voitiin varmistaa laitteiston puhtaus. Nollanäytteen suodatuksen aluksi keräin asetettiin desinfioituun 10 l sankoon, johon kaadettiin puhdasta vettä. Vettä pumpattiin ensin hetki putkiston läpi ilman suodatinta, jotta desinfioinnista mahdollisesti jääneet kemikaalit saatiin huuhdottua pois. Juoksutuksen jälkeen suodatin kasattiin asettamalla lasikuitusuodatin ja tiiviste suodatinpidikkeeseen puhtaalla pinsetillä, jonka jälkeen pidikkeen puolikkaat kiinnitettiin tiiviisti yhteen ruuveilla. Tuloputki kiinnitettiin suodatinpidikkeen tulopäähän ja poistoputki johdettiin poistopäästä mittakanisteriin. Nollanäytettä varten vettä suodatettiin 5 l, jonka jälkeen suodatinpidike purettiin ja sen sisällä oleva suodatin irrotettiin varovasti puhtailla pinseteillä, taiteltiin ja laitettiin näyteputkeen (Kuva 7), joka säilöttiin jäähäuteeseen kylmälaukkuun. Suodattimesta pidikkeen reunoille jääneet lasikuitujäämät huuhdottiin pois ultrapuhtaalla vedellä.

Varsinainen näytteenotto aloitettiin asettamalla näytekeräin sopivaan kohtaan 5–10 m päähän rannasta ja antamalla sen vajota pohjaan (Kuva 8). Näytekeräimen sisällä olevan tuloputken päässä oli metalliverkosta tehty karkea suodatin (reikäkoko noin 1 mm), mikä esti isompien partikkelien pääsyn putkistoon suodatuksen aikana. Ennen näytepumpun alkua seurattiin kiintoaineen laskeutuminen näytekeräimen läheisyydestä, ja ennen varsinaisen eDNA-näytteen keräämistä vettä pumpattiin tuloputken läpi, jolloin varmistettiin silmämääräisesti, ettei näyteveden mukana tule ylimääräistä kiintoainesta. Varsinaisen eDNA-näytteen otossa toistettiin samat työvaiheet kuin nollanäytteen suodatuksessa. Mikäli suodatettu vesimäärä ei ylittänyt 2 l, suodatettiin samalta näytteenotto paikalta toinen näyte tukkeutuneen suodattimen vaihdon jälkeen.



KUVA 7 Vasemmalla suodatinpidike ja näyteveden ruskeaksi värjäämä suodatin. Oikealla suodatin taiteltuna steriiliin näyteputkeen. Kuva: Timo Ruukonen.



KUVA 8 Vasemmalla näytekeräin asetettuna puroon ja oikealla keräin heitettynä järveen. Kuvat: Timo Ruukonen

Näytteenotossa noudatettiin erityistä varovaisuutta eDNA-kontaminaation välttämiseksi. Jokaiselle näytteelle oli oma desinfioitu välineistö pakattuna erillisiin Minigrip-pusseihin ja desinfiotuihin sankoihin. Välineitä käsiteltäessä käytettiin ntriilisuojarahanskoja, jotka desinfiotiin jokaisen erillisen työvaiheen välissä 95 % etanolilla. Kerätyt eDNA-näytteet siirrettiin kentältä paluun jälkeen -20 °C lämpötilaan odottamaan eDNA-määrittystä.

2.2.5 Näytteenottovälineiden puhdistus ja rapuruton leviämisen estäminen

Jokaisen näytteenoton jälkeen kaikki veden kanssa kosketuksissa ollut välineistö desinfiotiin käyttäen Virkon S -liuosta rapuruton leviämisen estämiseksi. Lisäksi eDNA-näytteenotossa käytetyt välineet desinfiotiin laboratoriossa upottamalla ne natriumkloriittiliuokseen (NordClean Klor, klooripitoisuus 10 % <math>< Cl < /math> < 20 %< /math>) DNA-jäämien ja patogeenien tuhoamiseksi. Oletetut ravuttomat kohteet ja jokirapukohteet ravustettiin ja eDNA-näytteet kerättiin ennen täplärapukohteille siirtymistä, jolla minimoitiin mahdollinen rapuruton siirtyminen täplärapuvesistä muihin vesiin.

2.2.6 Rapusaaliin käsittely

Pyynnissä saaduista ravuista määritettiin laji, sukupuoli ja mitattiin selkakilven pituus. Lisäksi kirjattiin ylös muut havainnot ravun yleiskuntoon liittyen, kuten ruhjeet ja rapuruttoläiskät. Mertakohtaiset yksilömäärät kirjattiin ja laskettiin niiden perusteella yksikkösaalis. Käsittelyn jälkeen ravut palautettiin takaisin vesistöön, mikäli paikallisella vesialueen omistajalla ei ollut erillisiä toivomuksia saaliin jatkokäsittelyyn liittyen.

2.3 eDNA-analyysi

2.3.1 DNA:n eristäminen suodattimilta

Analyysin aluksi sulatetut ja kosteat suodattimet kuivatettiin tyhjiössä, jolloin ylimääräisestä vedestä päästiin eroon. Kuivatetut suodattimet säilöttiin $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pakastimessa ennen DNA:n eristämistä. Näytteiden käsittelyn kaikki työvaiheet järjestettiin siten, että näytesuodattimien kontaminaatio estettiin.

Kuivatut suodattimet hienonnettiin aluksi morttelilla, mutta myöhemmin pipetin kärkeä käyttäen koeputkessa. Morttelin käytön todettiin olevan työläs ja aikaa vievä menetelmä. Se myös altisti näytteet kontaminaation mahdollisuudelle. Eristämisen alkuvaiheessa koeputkiin lisättiin 4 ml CTAB-puskuria (20 g l^{-1} CTAB, 1.4 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, 20 mM Na₂EDTA), jolloin suodattimen hienontaminen oli helpompaa.

Hienonnettu suodatin jäähdytettiin kuivajäällä $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ lämpötilaan 30 minuutin ajaksi solujen rikkomiseksi. Kylmäkäsittelyn jälkeen näytteet sulatettiin $+65\text{ }^{\circ}\text{C}$ vesihauteessa 15 minuutin ajan. Sulatuksen jälkeen näytteisiin lisättiin 40 μl proteiinikinaasi K -entsyymiä (20 mg ml^{-1}), näyte sekoitettiin ja inkuboitiin $+65\text{ }^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa tunnin ajan.

Entsyymikäsittelyn jälkeen putkiin lisättiin 4 ml kloroformia, jolla uutettiin vesifaasi. Putken sisältöä sekoitettiin, jonka jälkeen se sentrifugoitiin 15 minuutin ajan nopeudella 3800 rpm $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa. Sentrifugoinnissa erottunutta vesifaasia pipetoitiin 1500 μl kahteen 2 ml:n eppendorf-putkeen (A- ja B-putket). Ensimmäisen erottelun jälkeen kumpaankin näyteputkeen lisättiin 500 μl kloroformia, sekoitettiin vorteksilla ja sentrifugoitiin 5 minuutin ajan nopeudella 12000 rpm $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa. Syntyneestä vesifaasista pipetoitiin 1200 μl uusiin koeputkiin (putket nimettiin alkuperäisen näytteen mukaan, esim. näyte Siikajärvi 1A \rightarrow 80A ja 80B).

Koeputkiin lisättiin 800 μl $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ isopropanolia ja sekoitettiin edestakaisin käänellen. Putkia säilytettiin $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa 15 minuutin ajan, jonka jälkeen niitä sentrifugoitiin 15 minuutin ajan nopeudella 12000 rpm. Syntyneen DNA-sakan päältä poistettiin ylimääräinen supernatantti varovasti pipetoimalla.

Tiivistynyt DNA-pelletti pestiin 500 μl :lla $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 70 % etanolia, minkä jälkeen sentrifugoitiin 5 minuutin ajan nopeudella 12000 rpm. Etanoli pipetoitiin pois vahingoittamatta syntynyttä DNA-pellettiä. DNA-pelletti kuivattiin vakuumisentrifuugilla ja kuivattu DNA-pelletti liuotettiin 100 μl :aan TE-puskuria, sekoitettiin ja säilöttiin pakastimessa $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa ennen seuraavia tutkimusvaiheita. Eristetyn DNA:n pitoisuus ja puhtaus mitattiin NanoDrop-laitteistoa käyttäen.

2.3.2 Alukkeet ja standardit

Alukkeet valmistettiin kaupallisista valmisteista, jotka laimennettiin 100 mM vahvuuteen steriilillä milliQ-vedellä. Positiivistandardit valmistettiin täpläravun, jokiravun tai rapuruton DNA:ta sisältäneistä aiemmista DNA-eristyksistä. Standardien DNA-pitoisuus mitattiin Qbit-fluorometrillä. Alkuperäisten DNA-eristeiden pitoisuudet olivat jokirapustandardille $70,4\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$, täplärapustandardille $146,6\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$ ja rapurutolle $266,3\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$. Kustakin tutkittavasta DNA:sta valmistettiin 10 laimennoksen laimennossarja.

2.3.3 qPCR-analyysi

Aluksi qPCR-analyysi tehtiin Mx3000P qPCR -laitteistolla (Agilent), mutta laitteen antamat tulokset eivät olleet johdonmukaisia eikä sillä voitu analysoida täpläravun VIC-tunnistimia. Tämän jälkeen siirryttiin käyttämään LightCycler 480 (Roche) -analyysilaitteistoa sen paremman luotettavuuden ja VIC-tunnistimien analysointimahdollisuuden vuoksi.

Havaitsimme, että qPCR-analyysiolosuhteet jokiravulla ja täpläravulla olivat identtiset alukkeiden kiinnittymislämpötilan (annealing temperature) ollessa +60 °C. Rapuruttoanalyyseissa alukkeiden kiinnittymislämpötila oli puolestaan +62 °C. Käytettävä reaktioseos koostui kunkin tutkittavan organismin kohdalla kullekin ominaisista alukkeista ja leimatuista tunnistimista. Reaktioliuoksena käytettiin Thermo Fisherin Environmental MasterMix 2.0. Kunkin qPCR-reaktion kokonaistilavuus oli 20 µl, jossa näyte/standarditemplaattia oli 5 µl (Taulukko 3).

TAULUKKO 3 qPCR-määrittämisessä käytetty reaktioseos.

Reagenssi	Loppukonsentraatio	Tilavuus, µl/reaktio
NF vesi		0,6
Aluke 1 (Forward Primer, 5µl)	0,5 µM	2,0
Aluke 2 (Reverse Primer, 5µl)	0,5 µM	2,0
Tunnistin (Probe, 10µl)	0,2 µM	0,4
Reaktioliuos (EMM 2.0)	1x	10,0
Yhteensä		15,0

Lisää 5 µl näytetemplaattia, jolloin kokonaistilavuus 20 µl.

3 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

3.1 Mertapyynti, kolopyydykset ja havainnointi

Mertapyyntillä saatiin rapuja yhdeksästä kohteesta (Taulukko 4), joista Peltojoen, Könkköjoen, Peurunkajoen ja Herajärven yksikkösaalis kuvastaa runsasta rapukantaa (Erkamo & Tulonen 2018). Saaliittomia kohteita olivat Haapajoki, Järnätjärvi ja Saajoki. Herajärven, jossa esiintyi molempia lajeja, noin 87 % saaliista oli jokirapuja ja 13 % täplärapuja. Saaliiksi saaduilla ravuilla ei havaittu yhdessäkään kohteessa ulkoisia viitteitä rapurutosta.

TAULUKKO 4 Mertapyyntien yksikkösaalis (yks. mertayö⁻¹), käytettyjen mertojen lukumäärä, kokonaissaalis (kpl), saaliiksi saatu laji (jokirapu = JR, täplärapu = TR) ja saaliin sukupuolijakauma (naaras : koiras). *Peltojoen kohdalla paikallisen kalastajan ilmoittama arvio saadusta yksikkösaaliista. Herajärvellä yksikkösaalis laskettu jokiravulle ja täpläravulle erikseen.

Kohde	Yksikkösaalis	Mertojen lkm	Kokonais-saalis	Laji	Sukupuolijakauma (naaras : koiras %)
Haapajoki	0,0	40	0	-	-
Järnätjärvi	0,0	40	0	-	-
Saajoki	0,0	40	0	-	-
Siikajärvi	0,4	38	15	JR	67 : 33
Kolmisoppinen	0,7	38	27	JR	70 : 30
Köhniönpuuro	0,1	26	1	JR	0 : 100
Köhniönjärvi	0,2	40	9	JR	44 : 56
Peltojoki	6--7*	-	-	JR	-
Könkköjoki	4,9	40	196	TR	49 : 51
Sääksjärvi	0,2	40	7	TR	57 : 43
Peurunkajoki	7,0	20	140	TR	57 : 43
Herajärvi	2,9/0,5	38	109/17	JR, TR	33 : 67/53:47

Kolopyydyksillä saatiin saalista yhdestä jokirapukohteesta (Siikajärvi) ja yhdestä täplärapukohteesta (Peurunkajoki). Vesikiikareilla ja kahlaamalla rapuhavainnointia saatiin kahdesta täplärapujoesta (Könkköjoki ja Peurunkajoki).

3.2 eDNA-menetelmä

3.2.1 Näytteenoton ja analyysien toimivuus

Ennen varsinaista näytteenottoa suodatetut nollanäytteet (vesijohtovesi) olivat kaikissa qPCR-analyyseissä negatiivisia. Tämä varmisti sen, että näytteenottolaitteisto oli puhdas aina siirryttäessä uuteen näytteenottopisteeseen eikä kontaminaatiota tapahtunut.

Molekyylibiologisen tutkimus- ja kehitysosuudessa käytettiin kirjallisuudessa raportoituja menetelmiä ja niissä käytettyjä reagensseja. Lähtökohtaisena oletuksena oli, että jo reilun vuosikymmenen ajan kehitettyjen menetelmien soveltaminen onnistuu jo siksi, että kehitystyö oli aloitettu Suomessa yhdessä norjalaisten tutkimuslaitosten kanssa (Strand ym. 2012, Makkonen ym. 2013).

Tässä hankkeessa ei keskitytty eDNA-menetelmän erityisempään jatkokehitykseen, mutta laimentamattomissa näytteissä havaitun inhibiition takia testattiin näytteiden laimennusta. Testien tuloksena päädyttiin ottamaan rutiinikäyttöön 1/10-näytelaimennos, sillä niissä qPCR-reaktio ja DNA:n monistuminen oli varmempaa kuin laimentamattomissa näytteissä. Ilmeisesti pintavesien eloperäinen aines ja muut yhdisteet haittaavat DNA:n monistumista. Orgaanisen aineksen on todettu haittaavan eDNA-näytteen tutkimusta myös aiemmissa julkaisuissa (mm. Strand ym. 2011), jonka vuoksi qPCR-analyysissä on käytetty eloperäisen aineksen aiheuttamia haittoja ehkäisevää reaktioseosta (Environmental Master Mix 2.0).

Osa ensimmäisen qPCR-analyysin tuloksista jouduttiin hylkäämään teknisen häiriön vuoksi, sillä käyttämämme PCR-laitteisto ei toiminut analyysin vaatimalla tavalla. Syynä tämän PCR-laitteiston valintaan oli aiemmat hyvät kokemukset kyseisen laitteiston käytöstä vastaavissa eDNA-analyyseissä muissa tutkimuslaitoksissa (Strand ym. 2011). Syytä tähän laitevikaan ei tarkemmin selvitetty, vaan siirryttiin käyttämään uudempaa laitteistoa, joka todettiin soveltuvaksi myös hankkeessa käytettyyn qPCR-analyysiin.

Jokiravun ja rapuruton osalta sekä käytännön näytteenotto että laboratoriotutkimukset, erityisesti PCR-alukkeet ja tunnistimet, toimivat hyvin. Täpläravun alukkeet ja käytetty VIC-tunnistin eivät toimineet niin herkästi kuin odotettiin ja kuten kirjallisuudessa on aiemmin raportoitu (vrt. Agersnap ym. 2017). Tämä osa kaipaa lisätutkimuksia ja mahdollisesti myös kehitystyötä.

3.2.2 Rapujen esiintyminen

Jokirapukohteissa rapujen esiintyminen (eDNA) tunnistettiin luotettavasti niin tiheään kuin harvan kannan kohteilla (Taulukko 5). Mertapyyntin perusteella tiheään tai keskimääräisen jokirapukannan kohteissa positiivinen tulos saatiin kaikista tai lähes kaikista analysoiduista eDNA-näytteistä. Alhaisen kannan kohteilta saatiin positiivinen tulos pienemmästä osuudesta näytteitä (Köhniönjärvi 3/5, Köhniönpuuro 2/5), mikä viitanee alhaisempaan DNA:n määrään vesistöissä. Haapajoelta kerätyistä näytteistä saatiin kaikissa qPCR-määrittelyissä selkeät merkit jokiravun DNA:sta, vaikka mertapyyntneissä niitä ei saatu saaliiksi (Taulukko 5). Syynä voi olla mertapyyntin kohdistuminen alueelle, jossa oli hyvin harva jokirapukanta, tai jokiravut olivat niin pieniä, etteivät ne pysyneet merroissa. On myös mahdollista, että itse Haapajoessa ei ole jokirapukantaa ja jokiravun DNA on

kulkeutunut veden mukana yläpuoliselta vesialueelta. Haapajoen yläpuolisesta Järnätjärvestä ei kuitenkaan löydetty merkkejä ravuista millään menetelmällä (Taulukko 5). qPCR-määritys antoi kuitenkin selkeän positiivisen tuloksen, joten Haapajoen osalta on syytä tarkastella jokiraputilannetta jatkossa tarkemmin.

Tiheän täplärapukantojen kohteissa (Peurunkajoki ja Könkköjoki) eDNA-määrityksissä tunnistettiin täplärapu osasta suodattimia (Taulukko 5). Runsaan rapukannan kohteissa täpläravun DNA:ta ja pieniä kudospaloja on todennäköisesti runsaasti vedessä ja niiden läsnäolo havaittiin qPCR-määrityksissä havaituista herkkyysongelmista huolimatta. Herajärven ja Sääksjärven eDNA-näytteistä ei löydetty täpläravun DNA:ta, vaikka koeravustuksissa täplärapuja saatiinkin saaliiksi. Tulosten tulkintaa vaikeuttavat havaitut ongelmat täpläravuilla käytettyjen alukkeiden ja tunnistimien herkkyydessä, mistä johtuen ei voida tarkasti sanoa, mikä osa jokirapuja heikommasta tunnistustehosta on menetelmästä johtuvaa ja mikä osa johtuu täplärapujen vähäisestä määrästä vesistössä.

Tutkituista eDNA-näytteistä löytyi *A. astaci* -sienen (rapuruttolaisen) DNA:ta kahdelta vesialueelta, Köhniönjärveltä ja Köhniönpurolta, joilla saatiin myös jokirapuja mertapyynnissä ja havaittiin jokiravun DNA:ta eDNA-näytteestä. Vesialueella esiintyy siten tuloksen perusteella sekä jokirapuja että rapuruttolainen. Jokiravun ja ruton esiintyminen samassa vesistössä ei ole mahdoton tilanne, mutta vaatisi lisätutkimuksia sillä yleensä jokiravut kuolevat rapuruttoon. Rapuruttolaisen DNA:ta löydettiin kummassakin tapauksessa vain yhdessä näytteessä, joten virrehavainnon mahdollisuus tulisi poissulkea tarkemmalla näytteenotolla. Varovaisuusperiaatteen mukaisesti näitä vesialueita tulisi tarkastella lähemmin (sekä jokiravut että vesialue), jotta voitaisiin varmentaa tai kumota tämä epätavallinen muttei mahdoton löydös.

Kaikista Saajoen eDNA-näytteistä saatiin rapuruttolaisesta juuri tunnistusrajan ulkopuolella olevia merkkejä, joita ei kuitenkaan pidetä varmana merkinä lajin esiintymisestä eDNA-määrityksissä. Tätä ei voi suoraan pitää merkinä rapuruttolaisen esiintymisestä tällä vesialueella vaan käytettyyn eDNA-menetelmään liittyvänä ominaisuutena. Menetelmä voi tunnistaa myös muita, tässä tapauksessa mahdollisesti rapuruttolaisen sukulaisiksi luokiteltavia oomykeettejä. Myös muissa kotimaisissa rapujen kudoksiin perustuvissa tutkimuksissa on havaittu, että ravut voivat kantaa rapuruttolaisen lähisukulaisia (Makkonen ym. 2019, Viljamaa-Dirks ym. 2019). Lisätutkimukset olisivat myös tämän löydöksen osalta mielenkiintoisia ja tarpeen.

Sääksjärven, Könkköjoen ja Peurunkajoen eDNA-näytteistä ei saatu jokirapujen osalta luotettavaa tulosta qPCR-määrityksissä, joten näiden osalta eDNA-määrityksen tulosta ei ole (Taulukko 5). Suoraa syytä näiden kolmen vesialueen jokirapunäytteiden epäonnistumiseen emme tunne, emmekä pystyneet tarkistusten jälkeen nimeämään myöskään todennäköisiä tekijöitä. Kaikki kolme vesialuetta ovat koeravustusten tuloksen perusteella täplärapuvesiä, joissa ei pitäisi olla jokirapuja. Tämän lisäksi vesialueella on eDNA-määrityksen mukaan merkkejä rapurutosta, joka sekin puoltaa jokiravun puuttumista näiltä vesialueilta.

TAULUKKO 5 Jokiravun ja täpläravun sekä rapuruton vesistökohtainen ilmentyvyys eri tutkimuskohteilla sekä eDNA-näytteissä (qPCR, positiiviset/näytemäärä) että mertapyyntissä (Yksikkösaalis, rapua per merta-yö, kpl). Näytemäärät vaihtelevat eri vesialueiden osalta, sillä suodatinnäytteitä kerättiin kaksi, jos ensimmäinen suodatettu näytemäärä oli alle 2 l. (Merkkien selitykset: e/o = näytteestä ei saatu luotettavaa tulosta).

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

¹ = paikallisen ravustajan antama arvio

3.3 Menetelmien vertailu

Perinteinen mertapyynti ja eDNA-menetelmä tuottivat pääosin samankaltaiset tulokset rapulajien esiintymisestä neljää poikkeusta lukuun ottamatta (Taulukko 6). Jokirapuja ei syystä tai toisesta havaittu mertapyynnillä, visuaalisella havainnoinnilla eikä putkipyydyksillä kahdella kohteella (Haapajoki ja Saajoki), joissa ennakkotietojen mukaan jokirapuja esiintyy tai on esiintynyt. Positiivinen eDNA-tulos näiltä kahdelta vesialueelta voi tarkoittaa, että vesistössä ei ole pyyntivahvaa jokirapupopulaatiota tai populaatio on hiljattain romahtanut (kuollut rapuruttoon ja näin eDNA on peräisin kuolleista ja pohjaan hautautuneista ja hajoavista rapuyksilöistä).

Täplärapuja ei havaittu eDNA-määrityksessä Herajärveltä, missä niitä tosin oli koeravustussaaliissa suhteessa vähemmän kuin jokirapuja. Mertasaaliin perusteella täplärapujen esiintyminen on Herajärvessä alueellisesti keskittynyttä (vain yksi eDNA-näyte tältä keskittymältä), mikä voi osaltaan selittää, ettei niitä havaittu eDNA-määrityksissä. Täplärapuja ei havaittu eDNA-määrityksessä myöskään Sääksjärveltä, jossa mertasaaliiden perusteella on harva täplärapukanta.

Mertapyynti on menetelmänä selvästi eDNA-menetelmää työläämpi maastotöiden osalta vaatien yleensä vähintään kaksi pyyntivuorokautta suurella määrällä mertoja. Tällöin mertapyyntiin kuluu kolme työpäivää. Lisätyötä tulee syöttien hankkimisesta ja välineiden desinfiointi vie myös aikaa. Koeravustukseen sisältyy selvästi eDNA-menetelmää suurempi riski rapuruton leviämisestä, mikäli samoja mertoja käytetään useissa vesistöissä. Mertapyynnissä saadaan kuitenkin tietoa rapukannan tiheydestä ja rakenteesta (sukupuoli- ja pituusjakaumat), joten se on suositeltava menetelmä, jos hankkeen tavoitteena on pelkän esiintymistiedon lisäksi saada muuta tietoa rapukannasta. On kuitenkin huomattava, että eDNA-menetelmän etuna on mahdollisuus rapuruton todentamiseen samanaikaisesti, mitä ei voi tehdä luotettavasti mertasaaliin silmämääräisellä tarkastelulla. Vesialueen rapuesiintymien karkeaan havainnointiin eDNA-menetelmä soveltuu hyvin ja päivässä saa kerättyä jopa kymmeniä näytteitä ja katettua siten laajan vesialueen. Paikallistuntemus on tärkeä ja auttaa eDNA-menetelmän näytepaikkojen valinnassa ja voi siten antaa hyvän kuvan vesialueen raputilanteesta.

TAULUKKO 6 Jokirapu- (JR), täplärapu- (TR) ja rapuruttohavainnot (RR) menetelmittäin.

Kohde	Merta	Kolopyydys	Havainnointi	eDNA
Haapajoki	-	-	-	JR
Järnätjärvi	-	-	-	-
Saajoki	-	-	-	JR
Siikajärvi	JR	JR	-	JR
Kolmisoppinen	JR	-	-	JR
Köhniönpuuro	JR	-	-	JR, RR
Köhniönjärvi	JR	-	-	JR, RR
Könkköjoki	TR	-	TR	TR
Sääksjärvi	TR	-	-	RR
Peurunkajoki	TR	TR	TR	TR, RR
Herajärvi	JR, TR	-	-	JR

Visuaalinen havainnointi vesikiikarin avulla ei tuottanut luotettavia tuloksia rapujen esiintymisestä vesistöissä verrattuna mertapyyntiin ja eDNA-menetelmään (Taulukko 6, sillä rapuja havaittiin vain kahdelta jokikohteelta. Molemmista kohteissa on tiheä täplärapukanta, mikä varmastikin edesauttoi havaintojen tekemistä. Havainnointi vaatii harjaantumista ja rapujen elinympäristön tuntemusta. Tutkimuksessamme havainnoinnit tehneillä henkilöillä ei ollut juuri aiempaa kokemusta ravuista ja niiden elinympäristöistä, mikä osaltaan varmasti vaikutti tulokseen. Menetelmä soveltuneekin kokeneelle rapuasiantuntijalle, mutta yleiseen käyttöön se on liian epävarma.

Myöskään putkipyydykset eivät tuottaneet vakuuttavia tuloksia verrattuna perinteiseen koeravustukseen merroilla tai eDNA-menetelmään (Taulukko 6), sillä niillä saatiin vain yksittäisiä havaintoja ravuista. Putket ovat toimineet hyvin yksittäisessä kokeessa (Green ym. 2018), mutta voi olla, että tutkimuskohteillamme oli esimerkiksi riittävästi sopivaa elinympäristöä tarjolla suhteessa rapukannan kokoon, joten ravuilla ei ollut tarvetta mennä putkiin. Lisäksi putkien asettaminen pohjalle sopivaan asentoon osoittautui etenkin järvien rannoilla hankalaksi. Putkirivistö vaatii jonkin verran asettelua, että putket ovat pohjassa siten, että ravut pääsevät putkiin.

3.4 Suositukset ja jatkotoimet

Vesistöjen rapukannan tai rapuruttotilanteen arvioinnissa eDNA-menetelmä on tietyissä rajoissa toimiva kartoitusmenetelmä. Kohde-eliöiden DNA:n löytyessä suodatetusta eDNA-näytteestä voidaan selkeästi päätellä eliön olleen näytteenoton piirissä näytteenoton ajankohtana. Jos kohde-eliöiden DNA:ta ei löydy, tilanne mutkistuu sillä negatiivinen tulos voi johtua myös muistakin tekijöistä kuin siitä, että niitä ei ole vesistöissä. Rapujen osalta monet biologiset ja ekologiset tekijät vaikeuttavat negatiivisen näytetuloksen tulkintaa ja tekevät siitä epävarman. Näytteenotossa on tärkeää valita näytekohteet paikallistietoon ja yleiseen rapubiologiseen näkemykseen pohjautuen rapujen todennäköiseltä elinalueelta.

Tulostemme perusteella jokiravun esiintymistä selvittäessä näytekohteet tulisi arviomme mukaan olla pienehköiltä virtavesiltä ja järviltä vähintään 5 suodatettua vesinäytettä otettuna vesialueen ravuille sovelialta ranta-alueilta tai matalikoilta. Täplärapun osalta analyyseissä havaittujen herkkyysohjelmien vuoksi tarvitaan lisäselvityksiä ja menetelmän kehittämistä, että voidaan ottaa kantaa riittävään näytemäärään. Rapuruton havaitsemiseksi viisi näytettä vaikutti riittävältä, mutta tuloksissa esiintynyt vaihtelu täplärapupaikkojen välillä ja yksittäiset ruttohavainnot jokirapukohteilta osoittavat, että menetelmän luotettavuuden tulkinta ja riittävän näytemäärän arviointi vaatii vielä lisäselvityksiä. Esimerkiksi täplärapupaikoista Könkköjoen ja Herajärven negatiiviset rapuruttotulokset voivat johtua siitä, että täplärapukanta on molemmissa kohteissa rutoton.

Vesinäytteen koko on perinteisessä eDNA-menetelmässä erittäin rajallinen, tavallisesti alle 5 l (vrt. Strand ym. 2012, Rusch ym. 2020). On siten tunnettava vesialue, jolta näyte otetaan rapukannan tilan tai rapuruttolaisen esiintymisen selvittämiseksi, sillä vain hyvin kohdennettu näytteenotto antaa luotettavan tuloksen. Ainoastaan virtavesissä, erityisesti kapeilla jokialueilla, voi olettaa eDNA-menetelmän näytteen olevan pääsääntöisesti edustava. Yhtenä merkittävänä kehityskohtana on yhä eDNA-menetelmän näytettä varten suodatettavan vesitilavuuden kasvattaminen muutamasta litrasta useaan

kymmeneen litraan, jolloin rajallisilta vesialueilta otettavan näytteen luotettavuus todennäköisesti kasvaisi merkittävästi.

Arviomme mukaan eDNA-menetelmän näytteiden molekyylibiologisen tutkimisen vaatima työmäärä ja kustannus on kohtuullinen laboratoriotöiden osalta. Esimerkiksi 10 eDNA-menetelmän näytteen laboratoriotyöt vievät kolme päivää (kustannus noin 600 €, laborantin töitä), joista kaksi kuluu eDNA-menetelmän näytteiden esikäsittelyssä (DNA:n eristäminen, tutkimuksen vaatimat näytteen puhdistukset ja laimennukset, nollanäytteet, standardien valmistaminen, yms.) ja yksi päivä kuluu itse qPCR-ajoissa (laborantin töitä). Reagenssi- ja materiaalikulut ovat 10 eDNA-menetelmän näytteen osalta noin 15 € / näyte (rinnakkaiset, nollanäytteet ja standardit), yhteensä siten noin 150 €. Raportointiin kuluu puoli päivää (noin 100 €, laborantin töitä). Täten eDNA-menetelmän näytteiden laboratoriotöille tulisi hintaa noin 850 €. Tähän tulee mukaan peruseräraportti eDNA-menetelmän näytteiden tutkimustuloksista (positiivinen vs. negatiivinen ja positiivisten osuus).

Tällä hetkellä on Suomessa eDNA-analytiikkaa tekeviä laboratorioita yliopistoilla ja tutkimuslaitoksilla (mm. LUKE, SYKE), jotka kehittävät menetelmää ja tekevät analyysejä pääasiassa tutkimuskäyttöön erilaisissa tutkimushankkeissa. Luonnonvarakeskus on käynnistänyt eDNA-analyysein erikoistuneen laboratorion kehittämisen, missä tehdään mm. kaloihin ja rapuihin liittyvää eDNA-analytiikkaa erittäin herkällä dPCR-menetelmällä (digitaalinen PCR). Tietojemme mukaan kaupallisia toimijoita ei tällä hetkellä ole Suomessa, mutta kiinnostus eDNA-menetelmää kohtaan on kovaa myös ympäristöalan konsulttiyrityksissä. Tilanne muuttuu todennäköisesti lähivuosina, sillä Euroopassa toimii useita yrityksiä, jotka tekevät eDNA-analyysejä tilauksesta asiakkaille.

KIITOKSET

Suuret kiitokset osakaskunnille pääsystä rapuvesille. Jonna Kuha, Ahti Karusalmi ja Juha Ahonen avustivat hankkeen valmisteluissa. Erityiskiitokset putkipyydysten kehitystyöstä ja valmistamisesta. Kiitokset David Strandille (Oslo yliopisto) ja Lennart Edsmanille (Ruotsin maatalousyliopisto) eDNA-menetelmään liittyvistä keskusteluista ja neuvoista mukaan lukien kommervenkit. Hankkeen rahoitti Maa- ja metsätalousministeriö erityisavustuksella kalatalouden edistämiseen.

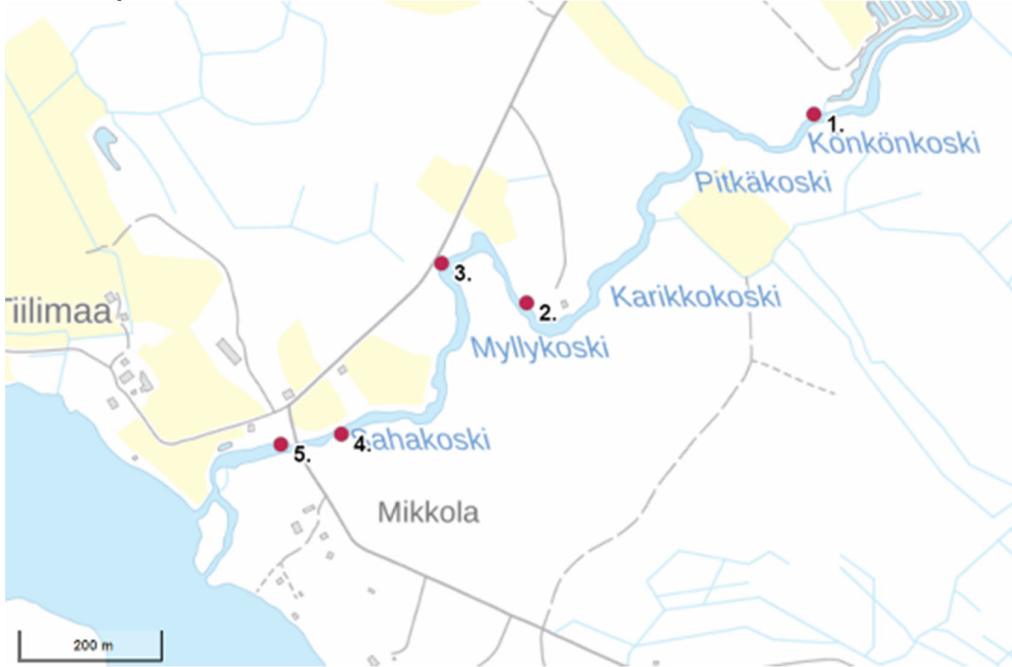
- Agersnap S., Larsen W.B., Knudsen S.W., Strand D., Thomsen P.F., Hesselsøe M., Bondgaard Mortensen P., Vrålstad T. & Møller P.R. 2017. Monitoring of noble, signal and narrow-clawed crayfish using environmental DNA from freshwater samples. *PLoS One* 12(6), e0179261.
- Cai W., Ma Z., Yang C., Wang L., Wang W., Zhao G., Geng Y. & Yu D.W. 2017. Using eDNA to detect the distribution and density of invasive crayfish in the Honghe-Hani rice terrace World Heritage site. *PLoS ONE* 12(5), e0177724.
- Cowart D.A., Breedveld K.G.H., Ellis M.J., Hull J.M. & Larson E.R. 2018. Environmental DNA (eDNA) applications for the conservation of imperiled crayfish (Decapoda: Astacidea) through monitoring of invasive species barriers and relocated populations. *Journal of Crustacean Biology* 38: 257–266.
- Dougherty M.M., Larson E.R., Renshaw M.A., Gantz C.A., Egan S.P., Erickson D.M. & Lodge D.M. 2016. Environmental DNA (eDNA) detects the invasive rusty crayfish *Orconectes rusticus* at low abundances. *Journal of Applied Ecology* 53: 722–732.
- Dunn N., Priestley V., Herraiz A., Arnold R. & Savolainen V. 2017. Behavior and season affect crayfish detection and density using environmental DNA. *Ecology and Evolution* 7: 7777–7785.
- Erkamo E., Ruokonen T., Alapassi T., Ruokolainen J., Järvenpää T., Tulonen J. & Kirjavainen J. 2010. Evaluation of Crayfish Stocking Success in Finland. *International Association of Astacology* 17: 77–83.
- Erkamo E. & Tulonen J. 2018. Rapukantojen hoito. Teoksessa Salminen M. & Böhling P. (toim.) *Kalavarojen käyttö ja hoito*. Luonnonvarakeskus, s. 541–580.
- Erkamo E. Tulonen J. & Kirjavainen J. 2019. Kansallinen rapustrategia 2019–2022. *Maa- ja Metsätalousministeriön julkaisuja* 2019:4, 1–80.
- Ficetola G.F., Miaud C., Pompanon F. & Taberlet P. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* 4: 423–425.
- Green N., Bentley M., Stebbing P., Andreou D. & Britton R. 2018. Trapping for invasive crayfish: comparison of efficacy and selectivity of baited traps versus novel artificial refuge traps. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems* 419, 15.
- 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: 137–148.
- Ikeda K., Doi H., Terui S., Kato A., Mitsuzuka T., Kawai T. & Negishi J.N. 2019. Estimating native and invasive crayfish distribution in relation to culvert barriers with environmental DNA. *Freshwater Science* 38: 629–641.
- Johnsen S.I., Strand D.A., Rusch J.C. & Vrålstad T. 2020. Environmental DNA (eDNA) monitoring of noble crayfish *Astacus astacus* in lentic environments offers reliable presence-absence surveillance – but fails to predict population density. *Frontiers in Environmental Science* 8, 612253.
- Jussila J., Kokko H., Kortet R. & Makkonen J. 2013. *Aphanomyces astaci* PsI-genotype isolates from different Finnish signal crayfish stocks show variation in their virulence but still kill fast. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 411, 10.

- Jussila J., Makkonen J., Vainikka A., Kortet R. & Kokko H. 2014. Crayfish plague dilemma: how to be a courteous killer? *Boreal Environment Research* 19: 235–244.
- Larson E.R., Renshaw M.A., Gantz C.A., Umek J., Chandra S., Lodge D.M. & Egan S.P. 2017. Environmental DNA (eDNA) detects the invasive crayfishes *Orconectes rusticus* and *Pacifastacus leniusculus* in large lakes of North America. *Hydrobiologia* 800: 173–185.
- Makkonen J., Strand D. A., Kokko H., Vrålstad T. & Jussila J. 2013. Timing and quantifying *Aphanomyces astaci* sporulation from the noble crayfish suffering from the crayfish plague. *Veterinary Microbiology* 162: 750–755.
- Makkonen J., Kokko H., Gökmen G., Ward J., Umek J., Kortet R., Petrusek A. & Jussila J. 2019. The signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in Lake Tahoe (USA) hosts multiple *Aphanomyces* species. *Journal of Invertebrate Pathology* 166, 107218.
- Pursiainen M. & Viljamaa-Dirks S. 2014. Rapuruton vaikutukset Suomen raputalouteen. *Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos, Helsinki. Tutkimuksia ja selvityksiä* 5/2014: 1–37.
- Rees H.C., Maddison B.C., Middleditch D.J., Patmore J.R. & 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: 1450–1459.
- Robinson C.V., Webster T.M.U., Cable J., James J. & Consuegra S. 2018. Simultaneous detection of invasive signal crayfish, endangered white-clawed crayfish and the crayfish plague pathogen using environmental DNA. *Biological Conservation* 222: 241–252.
- Ruokonen T.J., 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 management strategies. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 419, 27.
- Rusch J.C., Mojžišová M., Strand D.A., Svobodová J., Vrålstad T. & Petrusek A. 2020. Simultaneous detection of native and invasive crayfish and *Aphanomyces astaci* from environmental DNA samples in a wide range of habitats in Central Europe. *NeoBiota* 58: 1–32.
- Strand D.A., Holst-Jensen A., Viljugrein H., Edvardsen B., Klaveness D., Jussila J. & Vrålstad T. 2011. Detection and quantification of the crayfish plague agent in natural waters: direct monitoring approach for aquatic environments. *Diseases of Aquatic Organisms* 95: 9–17.
- 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: 1661–1673.
- Thomsen P.F. & Willerslev E. 2015. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* 183: 4–18.
- Viljamaa-Dirks S., Torssonon H., Heinikainen S., Pursiainen M., Rajala J., Mattila J., Laakkonen M., Partanen T., Sarajärvi K. & Korhonen P. 2012. Rapurutto hallintaan II. *RKTL:n työraportteja* 17/2013: 1–31.
- Viljamaa-Dirks S. & Heinikainen S. 2019. A tentative new species *Aphanomyces fennicus* sp. nov. interferes with molecular diagnostic methods for crayfish plague. *Journal of Fish Diseases* 42: 413–422.
- Väinölä R., Könönen K., Lakka H.-K., Uddström A., Mannerkoski I., Erkamo E., Arponen H., Keskinen E., Lanki M. & Laine A.O. 2019. Äyriäiset. Teoksessa: Hyvärinen E.,

- Juslén A., Uddström A., & Liukko U.-M. (toim.). *Suomen lajien uhanalaisuus – Punainen kirja 2019*. Ympäristöministeriö & Suomen ympäristökeskus, Helsinki, s. 344–348.
- Wittwer C., Stoll S., Thines M. & Nowak C. 2019. eDNA-based crayfish plague detection as practical tool for biomonitoring and risk assessment of *A. astaci*-positive crayfish populations. *Biological Invasions* 21: 1075–1088.

Liite 1. eDNA-näytteenottoaikat. Tutkimuksen muu rapuhavainnointi (mertapyynti, kolopyydykset, vesikiikarointi) tehtiin samoilla alueilla.

Könkköjoki



Herajärvi



Peltojoki

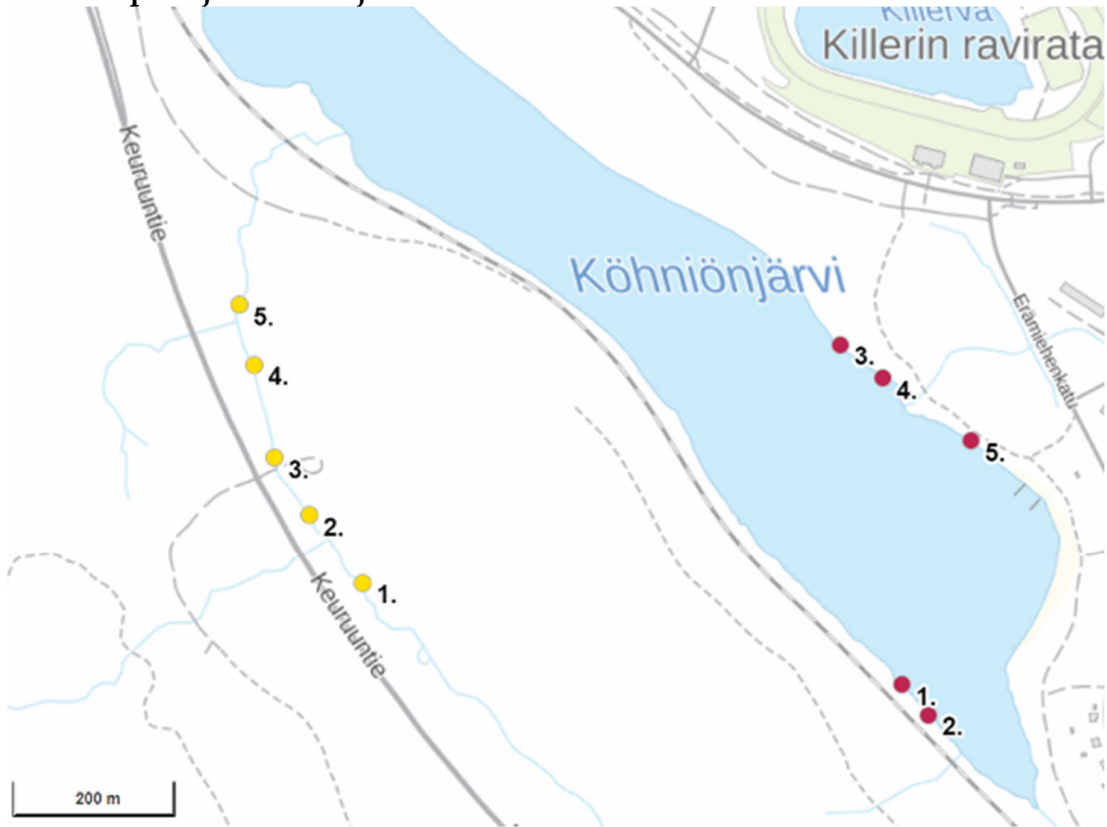


Peurunkajoki

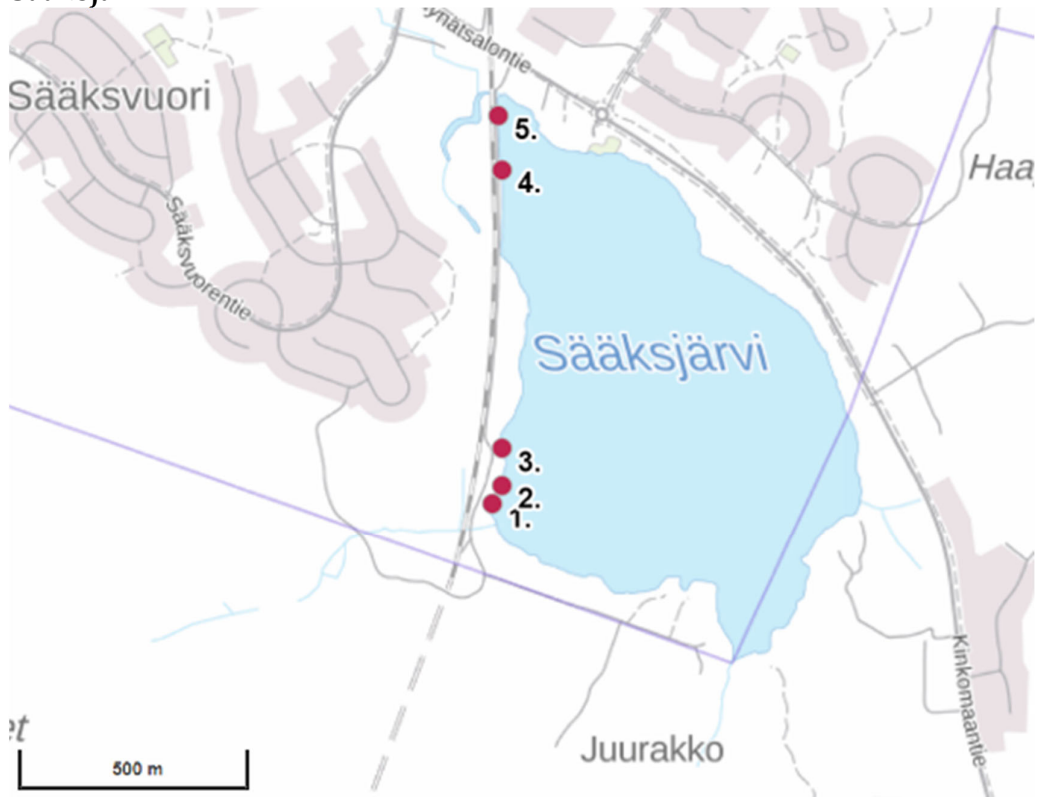


Siikajärvi

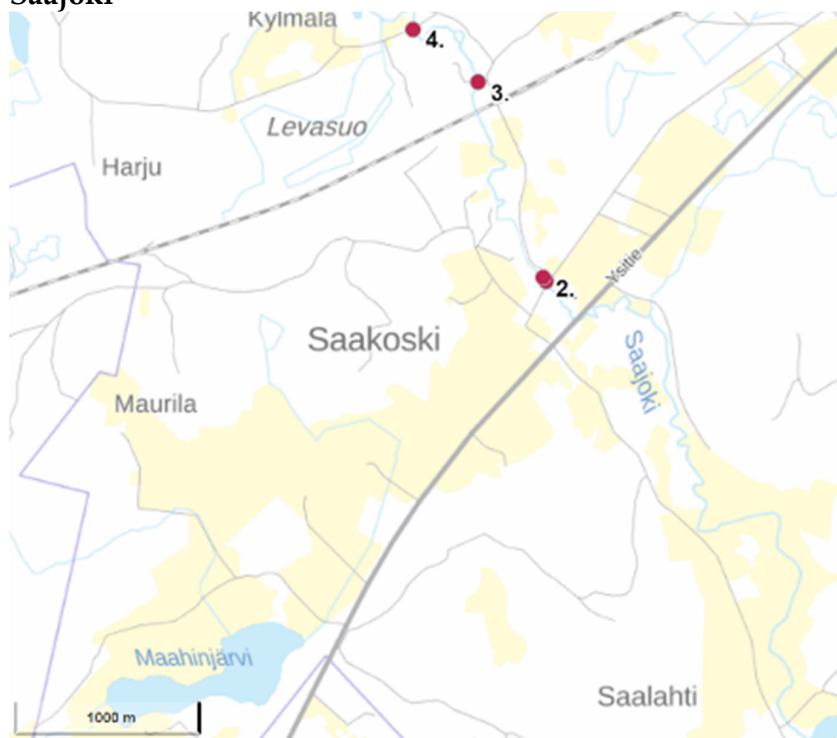


Köhniönpuro ja Köhniönjärvi**Kolmisoppinen**

Sääksjärvi



Saajoki



Haapajoki



Järnätjärvi

