

**KIRJOLOHEN DNA-MERKKIEN SEKÄ KOKO- JA
FILEOMINAISUUKSIEN VÄLISET YHTEYDET**

Kotieläinten jalostustiede
Pro gradu -tutkielma
Johanna Kuru
Helmikuu 2010

Sisällys

1. Johdanto.....	1
2. Aineisto ja menetelmät.....	3
2.1 Eläinaineisto.....	3
2.2 Tutkittavat ominaisuudet	4
2.3 Laboratoriomenetelmät.....	6
2.3.1 DNA:n eristys.....	6
2.3.2 Mikrosatelliittimerkkien valinta	6
2.3.3 Polymeerasiketjureaktio (PCR) ja PCR-tuotteiden analysointi	9
2.3.4 Näytteiden analysointi GeneMapper analyysiohjelmalla	10
2.4 Tilastolliset menetelmät	11
2.4.1 Käytetyt tilasto-ohjelmat.....	11
2.4.2 Merkin ja tutkittavan ominaisuuden yhteyden analysointi.....	12
3. Tulokset ja niiden tarkastelu.....	12
3.1 Tutkittavien ominaisuuksien jakaumat ja tilastolliset tunnusluvut	12
3.2 Tutkittavien ominaisuuksien väliset korrelaatiot	17
3.3 Genotyyppiaineiston tarkastelu.....	19
3.4 Tutkittavien ominaisuuksien ja mikrosatelliittien väliset tilastolliset yhteydet	20
3.4.1 Koko-ominaisuudet	21
3.4.2 Fileen väriin liittyvät ominaisuudet.....	24
3.5 Genotyyppien vaikutusten tarkastelu	26
3.5.1 Koko-ominaisuudet	26
3.5.1 Fileen väriin liittyvät ominaisuudet.....	27
4. Yhteenveto ja johtopäätökset.....	30
Kiitokset.....	31
Kirjallisuus	32

Taulukot

Taulukko 1. Mikrosatelliitit, niiden kytkentäryhmät Nichols ym. (2003), sekä lähteet, joista mikrosatelliitit poimittiin.....	7
Taulukko 2. Tutkimuksessa käytettyjen mikrosatelliittimerkkien alkuosat, jotka muodostuvat lohilajien tieteellisistä nimistä.....	7
Taulukko 3. Mikrosatelliitit, niiden koko emäspareina (bp), alukkeissa käytetty leima ja leiman tyyppi.	8
Taulukko 4. Kalan koko-ominaisuuksien ja fileen laatuominaisuuksien keskeiset tunnusluvut.	13
Taulukko 5. Kalan sukupuolen, sukukypsyyden ja kaihin keskeiset tunnusluvut.....	16
Taulukko 6. Kalan koko-ominaisuuksien jakautuminen kiinteiden tekijöiden (sukupuoli, sukukypsyys ja kaihi) luokkiin, niiden väliset keskiarvot (ka), sekä keskihajonnat (sd).	17
Taulukko 7. Fileen väriin liittyvien ominaisuuksien jakautuminen kiinteiden tekijöiden (sukupuoli, sukukypsyys ja kaihi) luokkiin, niiden väliset keskiarvot (ka), sekä keskihajonnat (sd).	17
Taulukko 8. F2-yksilöiden ominaisuuksien väliset fenotyypilliset korrelaatiot.....	18
Taulukko 9. Alleelien ja genotyyppien lukumäärät perheittäin, sekä alleelien määrien keskiarvo/mikrosatelliitti.	20
Taulukko 10. Mikrosatelliitit ja niiden kytkentäryhmät Nichols ym. (2003) mukaan, sekä varianssianalyysin F-arvot ja tilastolliset merkitsevyydet kalan pituutta, painoa ja filepainoa kuvaavissa muuttujissa.....	22
Taulukko 11. Mikrosatelliitit ja niiden kytkentäryhmät, sekä varianssianalyysin F-arvot ja tilastolliset merkitsevyydet fileen väriä kuvaavissa muuttujissa.	25
Taulukko 12. Pituuden, painon ja filepainon genotyyppien tarkastelu perheittäin kolmella eri mikrosatelliitilla, sekä genotyyppien saamien arvojen poikkeamat ominaisuuksien keskiarvosta.	27
Taulukko 13. Rochen, valoisuuden (lave) ja värikylläisyyden (cave) genotyyppien tarkastelu perheittäin kolmella eri mikrosatelliitilla, sekä genotyyppien saamien arvojen poikkeamat ominaisuuksien keskiarvosta.	28
Taulukko 14. Tutkittavien ominaisuuksien genotyyppien tarkastelu aiemmin mainituilla kuudella mikrosatelliitilla, genotyyppien saamat keskiarvot ja niiden poikkeamat tutkittavien ominaisuuksien keskiarvoista.	28

Kuvat

Kuva 1. Perheiden rakenne ja F2-polven yksilömäärät. P-polvi saatiin risteyttämällä amerikkalainen koiras (Am) JALO-kantaa olevalla naaraalla (JALO).....	4
Kuva 3. Omy4DIAS-merkin saamat genotyypit perheessä 804. F1-polven emä on genotyyppiä 157/157 ja isä 161/167. F2-polven yksilöiden saamat alleelit näkyvät kolmen korkeimman piikin kohdalla, saaden alleelit 157, 161 ja 167.	11
Kuva 4. F2-yksilöiden pituuden jakauma, sekä pituuden saamien arvojen normaalijakaumaa osoittava kuvaaja.	13
Kuva 5. F2-yksilöiden painon jakauma, sekä painon saamien arvojen normaalijakaumaa osoittava kuvaaja.	14
Kuva 6. F2-yksilöiden filepainon jakauma, sekä filepainon saamien arvojen normaalijakaumaa osoittava kuvaaja.	14
Kuva 7. F2-yksilöiden roche-arvojen jakauma, sekä rochen saamien arvojen normaalijakaumaa osoittava kuvaaja.	15
Kuva 8. F2-yksilöiden valoisuuden jakauma, sekä valoisuuden normaalijakaumaa osoittava kuvaaja.	15
Kuva 9. F2-yksilöiden värikylläisyyden jakauma, sekä värikylläisyyden normaalijakaumaa osoittava kuvaaja.	16

1. Johdanto

Kirjolohi (*Oncorhynchus mykiss*) on tärkein Suomessa viljeltävä ruokakalalaji. Sen tuotanto on pysynyt vakaana viime vuosina, ollen 12,6 miljoonaa kiloa vuonna 2008. Ruokakalaksi kasvatetun kirjolohen arvoksi saatiin 36,8 miljoonaa euroa, joka sisältää myös mädistä saatavan arvon. Kirjolohen mätiä tuotettiin elintarvikkeeksi noin 0,5 miljoonaa kiloa, mikä on viidenneksen enemmän kuin edellisenä vuonna. Kalankasvattajat saivat kirjolohesta keskimäärin 3,05 euroa/kg. Vuonna 2008 Suomessa oli toiminnassa yhteensä 508 kalanviljelylaitosta ja luonnonravintolammikkoviljelmää (Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos 2009). Viljelyn poikastuotanto tapahtuu pääosin sisävesissä ja varsinainen ruokakalatuotanto merialueilla. Merkittävät kilpailijat suomalaiselle kirjolohelle ovat norjalaiset lohikalat, lohi ja kirjolohi. Niitä tuotiin Suomeen vuonna 2007 noin 21,1 miljoonaa kiloa, josta kirjolohen osuus oli 2,2 miljoonaa kiloa. Samana vuonna Ruotsista tuotiin tuoretta kirjolohta 4,3 miljoonan kilon verran (Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos 2008). Filepainossa laskettuna suomalaiset kuluttavat kirjolohta 1,4 kiloa vuodessa henkeä kohden. Kulutus on pysynyt 1,4 - 1,6 kilon välillä koko 2000-luvun (Suomen Kalankasvattajaliitto ry 2009).

Kirjolohen taloudellisen merkityksen vuoksi Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos (RKTL) aloitti kirjolohen valintajalostusohjelman 1980-luvulla. Nykyisin valinnan perustana on vuodesta 1989 alkava yli 250 000 yksilön sukupuunaineisto. RKTL ja MTT:n (Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus) ylläpitämä kirjolohen valintajalostusohjelma (JALO-valintaohjelma) käynnistyi vuonna 1992. RKTL:n Tervon toimipaikka vastaa jalostusohjelmien käytännön toteutuksesta ja MTT puolestaan jalostussuunnittelusta ja jalostusarvosteluista. Jalostusohjelmassa kalat merkitään yksilötunnistein, joten arvostelussa voidaan käyttää hyväksi sekä yksilön omia että lähisukulaisten saamia tuloksia. Yksilöiden sukupuun ylläpitäminen mahdollistaa jalostusarvostelujen teon ja estää sukusiitosta nousemasta haitallisen korkeaksi. JALO:n jalostusarvostelussa on mukana kasvua, sukukypsyysikä, lihanväriä ja ulkomuotoa kuvaavia ominaisuuksia. Näiden lisäksi valintaohjelmassa tarkkaillaan muotovirheiden yleisyyttä sekä kaihin esiintymistä jalostuspopulaatiossa. Jalostus on jakautunut kahteen linjaan, joista Kasvu-linja on jalostettu alusta lähtien nopeakasvuiseksi ja se sopii hyvin lihan sekä mädin tuotantoon. Koska sukukypsyys heikentää lihan laatua ja kalan ulkomuoto-ominaisuuksia, keskittyy Marto-linja myöhäiseen sukukypsyysikään (Siitonen & Rissanen 1992, Kaune ym. 2003, Orenius, 2004).

Lohikalajien genomissa tapahtui tetraploidisaatio n. 50 - 100 miljoonaa vuotta sitten, joten monet geenit esiintyvät lohikalajien genomissa kaksinkertaisina (Allendorf & Thorgaard 1984). Kirjolohen genomien kooksi on arvioitu $2,4 \times 10^9$ emäsparia ja diploidisen kromosomilukumäärän (2N) on havaittu vaihtelevan lajin sisällä välillä 58 - 64 (Thorgaard 1983). Täydellisin kytkentäkarta kirjolohen kromosomistosta on ollut vuodelta 2003 (Nichols ym. 2003). Geneettinen kytkentäkarta käsittää samaan kromosomiin sisältyvien geneettisten merkkien järjestyksen ja vastaa siis aineellisesti kromosomia. Kirjolohen genomista on tehty viime vuosina useita muitakin kytkentäkartoja (Guyomard ym. 2006, Rexroad ym. 2008). Kirjolohen sytogeneettisesti havaittavien kromosomien ja molekyylogeneettisten merkkien välinen yhteys selvitettiin vuonna 2006 (Phillips ym. 2006).

Kiinnostus taloudellisiin ominaisuuksiin vaikuttavien geenien kartoittamiseen on lisääntynyt sitä mukaa, kun käytettävissä on entistä tiheämpiä geenikartoja merkkiavusteiselle valinnalle. Suurin osa kytkentäkartoissa olevista merkeistä on molekyylogeneettisiä. Mackayn (2001) mukaan monet lohikalajien kvantitatiivisista ominaisuuksista (esim. kalan koko) ovat

kromosomaalisten alueiden eli kvantitatiivisten ominaisuuksien lokusten (QTL, quantitative trait locus) kontrolloimia. Tietoa mahdollisista QTL:sta voidaan käyttää valintaohjelmassa ja siirrettäessä risteytysohjelmalla haluttua geeniä populaatiosta toiseen. Monet kaloilta vaikeasti mitattavat ominaisuudet olisivat jalostettavissa merkkiavusteisen valinnan avulla. Esimerkiksi vain toiselta sukupuolelta tai valittavien yksilöiden sisaruksista mitattavat ominaisuudet hyötyvät merkkiavusteisesta valinnasta, sillä geneettisten merkkien avulla voidaan valita kaloja, joista valittavaa ominaisuutta ei pystytä mittaamaan (Wenne ym. 2007). QTL:ien avulla voidaan tehdä valintaa esimerkiksi yritysten emokalaparvissa, joiden sukupuuta ei ylläpidetä eikä ominaisuuksia mitata (Kause 2009).

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää vaikuttaako yksi tai useampi QTL fileen väriin tai kalan kokoon. Tutkimuksessa käytetty F2-polven aineisto koostui neljästä risteytysperheestä, joissa P-polven isät olivat amerikkalaista kantaa ja emät JALO-kantaa. Geneettisinä merkkeinä käytettiin lohilajeilta löydettyjä mikrosatelliittimerkkejä. Mikrosatelliitit ovat DNA-merkkejä, jotka koostuvat lyhyistä toistojaksoista (1-6 emästä) ja jotka sisältävät tyypillisesti viidestä 20:een kopiota sijoittuneena tasaisesti yksilön genomiin (Williams 2005).

Mikrosatelliittigeenit eivät säätele mitään yksilön ominaisuutta tai elintoimintoja, vaan ovat pelkästään merkkigeenejä, jotka kertovat kunkin yksilön monimuotoisuuden tason.

Mikrosatelliittien oletetaan olevan neutraaleja geenejä joihin ei kohdistu luonnonvalintaa, joten mikrosatelliittigeeneissä tapahtuvat mutaatiot säilyvät populaatiossa. Koska mutaatioita tapahtuu paljon, on muuntelun määrä suuri ja hyvin pienetkin geneettiset erot eri populaatioiden ja jopa saman kannan eri ikäluokkien välillä on mahdollista löytää (Aho ym. 2002).

QTL-kartoitusta käyttämällä pyrittiin selvittämään löytyykö kirjolohen ruumiinkoko- ja fileen väriominaisuuksista suurivaikutteisia lokuksia, joihin kytkeytyneiden DNA-merkkien avulla kalamateriaalia pystyttäisiin tulevaisuudessa parantamaan merkkiavusteisella valinnalla. QTL-kartoitus on tilastollinen menetelmä, jonka avulla selvitetään eri ominaisuuksiin vaikuttavien lokusten sijainti genomissa. Falconerin ja Mackayn (1996) mukaan kaikki arviot QTL:n lukumäärästä ovat aliarvioita todellisesta tutkittavaan ominaisuuteen vaikuttavien lokusten määrästä. Läheisesti kytkeytyneet lokukset on vaikea erottaa toisistaan ja osa hyvin pienivaikutteisista QTL:sta jää huomiotta pienistä näytemäärästä johtuen.

Tässä työssä tutkituille kirjolohen file- ja väriominaisuuksille ei ole aiemmin löydetty QTL:ia. Araneda ym. (2005) löysivät hopelohelta (*Oncorhynchus kisutch*) RAPD-merkin, joka segregoitui fileen väriin liittyvien ominaisuuksien kanssa. Eläinmallin avulla laskettiin jalostusarvon ennusteet, jossa suotuisan fileen värin saaneet yksilöt saivat korkeimmat jalostusarvon ennusteet. Kyseinen DNA-merkki löytyi jokaiselta korkean jalostusarvon ennusteen saaneelta yksilöltä, mutta vain kolmannekselta matalan jalostusarvon ennusteen saaneelta yksilöltä. Muutamia QTL-tutkimuksia muista lohikaloille taloudellisesti tärkeistä ominaisuuksista löytyy viime vuosilta. Esimerkiksi kutuajalle, kalan koolle, painolle ja kuntoisuudelle on löydetty merkittäviä QTL-alueita. Martyniuk ym. (2003) tutkivat kasvuun liittyvien ominaisuuksien ja koiraiden sukukypsyysien välisiä korrelaatioita kirjolohella kahdessa kaupallisessa linjassa. Kalan kokoon vaikuttavia QTL:ia etsittiin kuudesta kytkentäryhmästä, joista O'Malley ym. (2003) olivat aiemmin havainneet kalan koon ja merkin välisiä yhteyksiä. Tutkimuksessa varmistui viiden kalan kokoon vaikuttavan QTL:n sijainti kyseisessä kytkentäryhmässä. Kalan kuntoisuudelle löytyi yksi QTL ja kolme suuntaa-antavaa aikaiseen sukukypsyysyteen vaikuttavaa QTL:sta toisesta tutkitusta linjasta.

Kutuajalla on tärkeä merkitys kirjolohen tuotannossa, sillä vuodenaikaan rajoittuneella kutemisella voi olla suuria vaikutuksia tuotannon tehokkuuteen. Sakamoton ym. (1999)

mukaan naaraan kutemiseen kolmen ja neljän vuoden iässä löydettiin neljä merkittävää QTL- aluetta sekä kaksi suuntaa-antavaa QTL:sta. Kaksi neljästä merkitsevistä kutuaajan QTL:stä voidaan luokitella suurivaikutteiseksi. O'Malley'n (2002) tutkimuksessa havaittujen QTL:ien lukumäärä ja laajuus antaa ymmärtää, että kutuaika voi olla muutamien suurivaikutteisten lokusten kontrolloima. Leder ym. (2006) käyttivät kandidaattigeenejä tarkentaakseen aiemmissa tutkimuksissa havaittujen QTL:ien sijainteja. Tutkimuksessa havaittiin yksitoista merkitsevää tai suuntaa-antavaa kutuaikaan liittyvää QTL:ta. Niistä suurin osa havaittiin vain toisella vanhemmista, mutta merkittävin sijaitsi molemmilla sukupuolilla kytkentäryhmässä kahdeksan, selittäen naarailla 20 % ja koirilla 50 % ominaisuudessa esiintyvistä vaihtelusta.

Joitakin QTL-tutkimuksia löytyy kirjolohen sukulaislajeilta, lähinnä lohelta (*Salmo salar*). Reid ym. (2005) havaitsivat lohella useita painoon ja kalan kuntoisuuteen vuoden iässä vaikuttavia QTL:ia tutkiessaan intervallikartoituksella kolmea täyssisarperhettä. Painolle löydettiin kaksi merkitsevää QTL:ta, kun taas kuntoisuudelle havaittiin merkitsevät QTL:t neljässä eri kytkentäryhmässä. Suurivaikutteisten lokusten lisäksi tutkimuksessa havaittiin homologisia alueita painolle joistakin kirjolohen ja nierian (*Salvelinus alpinus*) kytkentäryhmistä. Kolme kahdeksasta tutkitusta kytkentäryhmästä paljasti konservoituneita alueita lohen ja kirjolohen kytkentäryhmien välillä.

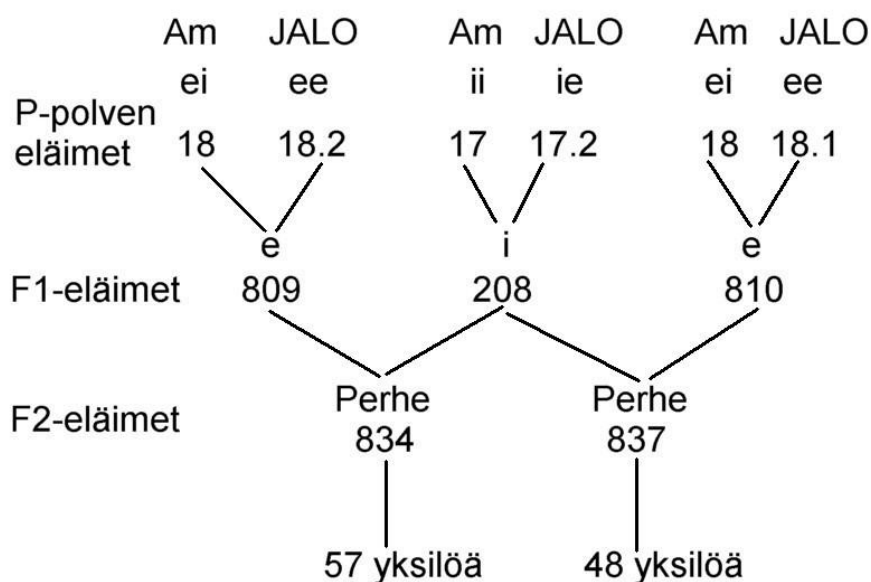
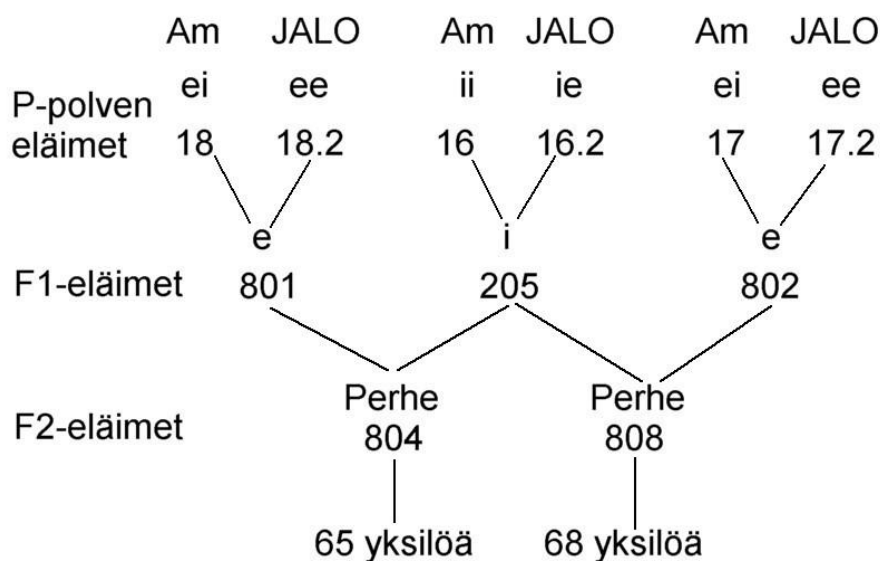
Tämä pro gradu -työ on osa hanketta ”Molekyylogeneettisten menetelmien hyödyntäminen kalojen valintajalostuksessa”. Tutkimushankkeessa kehitetään molekyylogeneettisiin merkkeihin ja niiden antamaan informaatioon perustuvia menetelmiä, joilla voidaan tehostaa kalojen valintajalostusohjelmia ja vähentää jalostustoiminnan kustannuksia. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää löytyykö kirjolohelta taloudellisesti tärkeille fileen väri – ja kalan koko-ominaisuuksille QTL:ia, jotta näihin ominaisuuksiin kytkettyneitä DNA-merkkejä voitaisiin käyttää yhtenä valintakriteerinä parhaiden jalostusyksilöiden valinnassa.

2. Aineisto ja menetelmät

2.1 Eläinaineisto

Aineisto koostui RKTL:n Tervon yksikössä pidettävien kantojen neljästä perheestä (804, 808, 834 ja 837) (Kuva 1). Yksilömerkittyjä kaloja oli kolmessa sukupolvessa, sukupolvenvälin ollessa n. 3 vuotta. Isovanhempaispolven eli P-polven muodostivat 3 naarasta ja 4 koirasta. Koiraat olivat ns. amerikkalaista kantaa (Savon Taimen Oy:ltä) ja naaraat olivat RKTL:n JALO-kantaa. Näiden jälkeläisiä eli F1-polven yksilöitä oli tutkimuksessa mukana 6 yksilöä, 4 naarasta ja 2 koirasta. F2-polven yksilöitä oli mukana yhteensä 272, josta yksilöiden näytemäärä väheni lopullisiin tuloksiin mennessä 238 yksilöön.

Perheillä 804 ja 808 sekä 834 ja 837 oli yhteiset isät, eli ne muodostivat koiraan puoleiset puolisisarryhmät. Perheet 804 ja 834 muodostivat emän puoleiset täyssisarryhmät, jonka lisäksi perheen 837 emä oli niiden puolisisar. Isänä perheissä 834 ja 837 toimiva koiras oli puolestaan 808 perheen emän täyssisar. P-polven risteytykset tehtiin RKTL:n Tervon kalanviljelylaitoksella keväällä 2000 ja F1-risteytykset keväällä 2003, joten sukupolvenväliksi tuli 3 vuotta. Kotieläintieteen laitoksen laboratorioon F1- ja F2-polven näytteet saatiin vuoden 2006 kesällä.



e = emä
 i = isä

Kuva 1. Perheiden rakenne ja F2-polven yksilömäärät. P-polvi saatiin risteyttämällä amerikkalainen koiras (Am) JALO-kantaa olevalla naaraalla (JALO).

2.2 Tutkittavat ominaisuudet

F2-polven yksilöiden tutkimuksessa käytetyt ominaisuudet mitattiin kolmannen kasvukauden jälkeen Tervossa syksyllä 2006. Tutkimukseen valittiin kuusi ominaisuutta, jotka voitiin jaotella kalan kokoon ja fileen väriin liittyviin ominaisuuksiin. Koko-ominaisuuksia olivat kalan pituus (mm), paino (g) ja filepaino (kahden fileen paino grammoina) ja fileen väriin liittyviä ominaisuuksia roche, valoisuutta kuvaava lave ja värikylläisyys eli cave.

Painolle on saatu aiemmissa tutkimuksissa keskinkertaisia tai korkeita periytymisasteita. Kause ym. (2002, 2007a) saivat painolle periytymisasteen arvioksi 0,20 ($\pm 0,06$)(2002) ja 0,29 ($\pm 0,02$)(2007a), kun taas Martyniukin ym. (2003) saama periytymisasteen arvio oli huomattavasti korkeampi 0,59 ($\pm 0,024$). JALO:n käynnistyttyä jalostuspopulaation ensimmäisen kesän kasvuun vaikuttavien tekijöiden arvioinnissa painon periytymisasteeksi saatiin 0,38 ja pituuden 0,35 (Siitonen & Rissanen, 1993). Myös filepainon saamat periytymisasteen arviot ovat keskinkertaisia 0,22 ($\pm 0,06$) (Kause ym. 2002) ja 0,31 ($\pm 0,03$) (Kause ym. 2007a). Periytymisasteen arvioiden perusteella voidaan olettaa, että kalan kokoon liittyvissä ominaisuuksissa suuri osuus havaitusta vaihtelusta on valinnalla hyödynnettävissä.

Fileen värillä oli kolme muuttujaa; roche, lave ja cave. Roche saatiin määrittämällä fileen väri visuaalisesti roche-värikortilla. Lave ja cave mitattiin kolmesti fileen kyljestä spektrofotometrillä ja lopullinen arvo muodostui kolmen mittauksen keskiarvosta. Suuret valoisuuden arvot tarkoittavat vaaleaa lihanväriä, joka on kirjolohella epäsuotuisa ominaisuus. Korkeat cave-arvot kertovat fileen suuresta värikylläisyydestä, joka on kirjolohella toivottua. Tutkimuspopulaatio ruokittiin koko kasvukauden ajan samalla kaupallisella rehulla ja ruokamäärällä, kuin jalostuspopulaatiot. Kalojen syömä rehu sisältää väriaineena toimivaa teollisesti valmistettua astaksantiinia. Skreden ym. (1989) mukaan kirjolohi ei pysty itse syntetisoimaan lihan punaisuutta tuottavaa karotenoidia, vaan sitä on saatava ravinnosta.

Kause ym. (2008) tutkivat ruokinnan vaikutusta lihan koostumukseen ja fileen väriin ja saivat tutkimuksessaan normaaliproteiinista ruokaa saaneiden kalojen lihaksen valoisuudelle korkean ($0,58 \pm 0,12$) ja fileen chromavärille eli värikylläisyydelle keskinkertaisen ($0,46 \pm 0,11$) periytymisasteen. Aiemmat tutkimukset ovat raportoineet matalampia periytymisasteita rochelle; 0,17, 0,28 ja 0,19 (Gjerde & Gjedrem, 1984, Gjerde & Schaeffer, 1989, Kause ym. 2002). Kause ym. (2008) mukaan voidaan olettaa roche-korttien antavan aliarvion, jos periytymisastetta laskettaessa on käytetty kategorisia muuttujia. Väriin liittyvien ominaisuuksien periytymisasteet osoittavat, että fileen väriä voidaan tehokkaasti parantaa valintajalostuksen avulla.

Tutkittaviin ominaisuuksiin vaikuttavia muuttujia oli mukana kolme: sukupuoli, sukukypsyys ja Diplostomum loismadon aiheuttama silmäkaihi. Sukupuoli jakoi eläimet kahteen luokkaan joko 1= koiraisiin tai 2= naaraisiin, joka sisälsi myös mittaushetkellä martoina olleet kalat. Sukukypsyys jakautui joko 1= mittaushetkellä sukukypsiin tai 0 = ei sukukypsiin. Kaihi luokiteltiin kolmeen luokkaan eli 0 = molemmat silmät kirkkaat, 1= yksi silmä samea kaihistä ja 2 = molemmat silmät sameana kaihistä. Kuukka-Anttila ym. (2010) havaitsivat tutkimuksessaan kaihille keskinkertaisen periytymisasteen ($0,35 \pm 0,09$). Suomessa kaihia on havaittu laitospopulaatioilla kaloilla enemmässä määrin ainakin 1990-luvun alkupuolelta lähtien (Kuukka ym. 2006). Diplostomum imumatoloinen aiheuttaa silmässä ns. loiskaihin, joka tunkeutuessaan kalan silmän linssiin aiheuttaa kalan sokeutumisen tai pahimmassa tapauksessa kalan kuoleman. Kaihin vaivaaman kalan on vaikea löytää ravintoa, jolloin sen kasvu hidastuu tai pysähtyy kokonaan.

2.3 Laboratoriomenetelmät

2.3.1 DNA:n eristys

P- ja F1-polven DNA-näytteet valmistettiin DNA-merkkien testausvaiheessa lysaatteina käyttäen Nam ym. (2003) menetelmää. Myöhemmin genotyyppityksessä käytetty DNA eristettiin Qiagenin piidioksidikalvoon perustuvalla puhdistusmenetelmällä (DNeasy Tissue Kit). F2-polven yksilöiden kudoksenäytteiden DNA eristettiin em. Qiagenin kitillä noudattaen ohjetta DNA:n eristämiseksi eläinkudoksesta. Näytteinä oli useimmiten eväpala, josta leikattiin alle 25 mg kudosta. Eri puhdistusmenetelmiä käyttäen saatiin lopputulokseksi DNA:ta sisältävä näyte. Valmiiden näytteiden DNA-pitoisuudet mitattiin käyttämällä spektrofotometria (Pharmacia GeneQuant). Nam ym. (2003) menetelmällä tehtyjen lysaattien konsentraatiot mitattiin etidiumbromidia sisältävillä agarmaljoilla. DNA-näytteet laimennettiin tarvitsemaamme konsentraatioon. Alkuperäiset kudoksenäytteet pakastettiin ja valmiista DNA-näytteistä tehtiin 5 ng/μl käyttöläimennokset.

2.3.2 Mikrosatelliittimerkkien valinta

Tutkimuksessa käytetyt mikrosatelliittimerkit oli kerätty sekvenssitietokannoista ja eri julkaisuista (taulukko 1). Suurin osa mikrosatelliittimerkeistä oli löydetty kirjolohelta, mutta myös muilla lohilajeilla toimivia merkkejä valittiin mukaan (taulukko 2). Alukkeiden sekvenssit testattiin ensin NetPrimer analyysiohjelmalla (Premier Biosoft International), jonka antamien luokitteluarvojen perusteella merkkien määrä väheni viidennekseen. Tilatuista mikrosatelliittialukkeista tehtiin 10 pmol/μl olevat käyttöliuokset.

Valittujen 240 merkin toimivuutta kokeiltiin P-polven ja F1-polven yksilöiden sukulaisten näytteillä ja suomalaisesta kirjolohipopulaatiosta eristetyillä kontrollinäytteillä, käyttämällä kahta DNA-analysaattoria Li-Cor4200S ja ABI3130. Jatkoon valittiin 69 mikrosatelliittia, joiden alleelit monistuiivat merkkitestin näytteillä ja joilla oli vahva intensiteetti, selkeä piikkiprofiili ja joissa oli muuntelua vähintään kahden alleelin verran. Merkkimäärää haluttiin kuitenkin kasvattaa, joten etsittiin uudet 48 merkkiä. Näistä valittiin 14 merkkiä aiemmin valittujen lisäksi käytettäväksi varsinaisessa merkkityypityksessä P-, F1- ja F2-polven näytteille.

DNA-monistuksessa PCR:n avulla käytimme joko kahta mikrosatelliittia reunustavaa aluketta, joista 5'-aluke oli leimattu fluoresoivalla leimalla (PET, FAM, VIC, NED) tai ns. M13-hännällistä aluketta (taulukko 3). Oetting ym. (1995) kuvaamassa menetelmässä on kolme aluketta, joista mikrosatelliittia reunustavan alukeparin 5'-alukkeeseen päässä on M13-sekvenssin sisältävä 19 emäsparin pituinen lisäsekvenssi. Kolmannella alukkeella on sama M13-sekvenssi, joka on leimattu fluoresoivalla leimalla (PET, FAM, VIC, NED, HEX).

Taulukko 1. Mikrosatelliitit, niiden kytkentäryhmät Nichols ym. (2003), sekä lähteet, joista mikrosatelliitit poimittiin.

Mikrosatelliitti	Kytkentäryhmä Nichols ym. 2003	Mikrosatelliitin lähde
Ogo1UW	OA-III	Olsen ym. 1998. <i>Molecular Ecology</i> 7:1087
Omm1009	OA-VIII	Rexroad ym. 2002. <i>Marine Biotechnology</i> 3: 12-16
Omm1046	OA-VI	Rexroad ym. 2002. <i>Marine Biotechnology</i> 3:12-16
Omm1117	OA-XVII	Rexroad ym. 2002. <i>Journal of Animal Science</i> 80: 541-542
Omm1359	OA-VI	Palti ym. 2003. <i>Animal Genetics</i> . 34:153-156.
Omm1360	OA-XVII	Palti ym. 2003. <i>Animal Genetics</i> . 34:153-156.
Omm1362	OA-XXII	Palti ym. 2003. <i>Animal Genetics</i> . 34:153-156.
Omm1364	OA-XXVII	Palti ym. 2003. <i>Animal Genetics</i> . 34:153-156.
Omy4DIAS	OA-XXIV	Spies ym. 2005. <i>Molecular Ecology Notes</i> 5:278-281.
Omy7INRA	OA-VII	Spies ym. 2005. <i>Molecular Ecology Notes</i> 5:278-281.
Omy9DIAS	OA-XXII	Spies ym. 2005. <i>Molecular Ecology Notes</i> 5:278-281.
Omy1000UW	OA-XX	Spies ym. 2005. <i>Molecular Ecology Notes</i> 5:278-281.
Omy1006UW	OA-XXXI	Spies ym. 2005. <i>Molecular Ecology Notes</i> 5:278-281.
Omy1011UW	OA-XI	Spies ym. 2005. <i>Molecular Ecology Notes</i> 5:278-281.
Omy1090UW	OA-XXI	Spies ym. 2005. <i>Molecular Ecology Notes</i> 5:278-281.
Omy1119UW	OA-XXVII	L-E. Holm, henkilökohtainen tiedonanto., Danish Institute of Agricultural Sciences. (Nichols ym. 2003).
Omy1191UW	OA-XIX	Nichols ym. 2003. <i>Animal Genetics</i> 34:102-115.
Omy1212UW	OA-II	L-E. Holm, henkilökohtainen tiedonanto., Danish Institute of Agricultural Sciences. (Nichols ym. 2003).
OmyRGT3TUF	OA-XII	Sakamoto ym. 2000. <i>Genetics</i> . 155, 1331-1345.
OmyRGT8TUF	OA-XV	Sakamoto ym. 2000. <i>Genetics</i> . 155, 1331-1345.
OmyRGT9TUF	OA-XXIII	Sakamoto ym. 2000. <i>Genetics</i> . 155, 1331-1345.
OmyRGT12TUF	OA-XVIII	Khoo ym. 2000. <i>Animal Genetics</i> 31:73-74.
OmyRGT19TUF	OA-XXIX	Sakamoto ym. 2000. <i>Genetics</i> . 155:1331-1345.
OmyRGT28TUF	OA-I	Sakamoto ym. 2000. <i>Genetics</i> . 155:1331-1345.
OmyRGT34TUF	OA-XXX	Sakamoto ym. 2000. <i>Genetics</i> . 155:1331-1345.
One6ASC	OA-IV	Olsen ym. 2000. 9: 2185-2187
One107ADFG	OA-V	Scribner ym.1996. <i>Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences</i> 53:833-41.
Ots513NWFSC	OA-X	Naish, K. & Park, L. 2002. <i>Animal Genetics</i> 33:316
Ots517NWFSC	OA-I	Naish, K. & Park, L. 2002. <i>Animal Genetics</i> 33:316
Ots522NWFSC	OA-XXIII	Naish, K. & Park, L. 2002. <i>Animal Genetics</i> 33:316
SSOSL32	OA-XI	Slettan ym.1997. <i>Heredity</i> 78:620-627.

Taulukko 2. Tutkimuksessa käytettyjen mikrosatelliittimerkkien alkuosat, jotka muodostuvat lohilajien tieteellisistä nimistä.

Merkin alkuosa	Tieteellinen nimi	Suomenkielinen nimi
Ogo	<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	kyttyrälohi
Omm, Omy	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	kirjolohi
One	<i>Oncorhynchus nerka</i>	punalohi
Ots	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	kuningaslohi
SS	<i>Salmo salar</i>	atlantinlohi

Taulukko 3. Mikrosatelliitit, niiden koko emäspareina (bp), alukkeissa käytetty leima ja leiman tyyppi.

Mikrosatelliitti	Koko (bp)	Leima	Leiman tyyppi
Ogo1UW	100-180	PET	5'-leima
Omm1009	225-280	FAM	5'-leima
Omm1046	100-170	VIC	5'-leima
Omm1117	193-252	TET	M13-hännällinen
Omm1359	178-209	VIC	M13-hännällinen
Omm1360	262-305	FAM	5'-leima
Omm1362	214-226	NED	5'-leima
Omm1364	237-382	VIC	5'-leima
Omy1006UW	180-260	FAM	5'-leima
Omy1090UW	241-271	HEX	M13-hännällinen
Omy1191UW	213-278	PET	5'-leima
Omy1191UW	213-278	FAM	M13-hännällinen
Omy1212UW	214-242	VIC	M13-hännällinen
Omy4DIAS	154-178	VIC	5'-leima
Omy7INRA	210-270	PET	5'-leima
Omy9DIAS	141-174	PET	M13-hännällinen
Omy1000UW	197-289	FAM	M13-hännällinen
Omy1011UW	178-210	FAM	M13-hännällinen
OmyRGT3TUF	147-161	FAM	5'-leima
OmyRGT8TUF	146-195	NED	5'-leima
OmyRGT9TUF	167-171	FAM	M13-hännällinen
OmyRGT12TUF	110-170	NED	5'-leima
OmyRGT19TUF	223-245	NED	5'-leima
OmyRGT28TUF	137-162	VIC	M13-hännällinen
OmyRGT34TUF	141-184	HEX	M13-hännällinen
One107ADFG	150-290	NED	5'-leima
One6ASC	200-450	VIC	5'-leima
Ots513NWFSC	378-386	FAM	M13-hännällinen
Ots517NWFSC	160-215	FAM	5'-leima
Ots522NWFSC	164-175	NED	M13-hännällinen
SSOSL32	117-171	FAM	M13-hännällinen

Mikrosatelliitteja valikoitui lopulta 31, jotka jakautuivat mahdollisimman tasaisesti kytkentäryhmiin. Seitsemään kytkentäryhmään (9, 13, 14, 16, 25, 26, 28) ei saatu toimivaa merkkiä, kun taas seitsemässä kytkentäryhmässä (1, 6, 11, 17, 22, 23, 27) oli kaksi mikrosatelliittimerkkiä. Sytogeneettisesti havaittavien kromosomien (Philips ym. 2006) ja molekyylogeneettisten merkkien kytkentäryhmittäisen (Nichols ym. 2003) sijoittumisen osalta vastaavuus löydettiin kolmen tutkimuksessa mukana olevan mikrosatelliitin osalta. Merkki Omy7INRA sijaitsee kytkentäryhmässä 7 vastaten kromosomia 7, Omy1011UW kytkentäryhmässä 11 vastaa kromosomia 27 ja Omy1191UW kytkentäryhmässä 19 vastaa kromosomia 11. Lopuille mikrosatelliiteille ei toistaiseksi ole kytkentäryhmää vastaavaa kromosomia varmennettu.

2.3.3 Polymeraasiketjureaktio (PCR) ja PCR-tuotteiden analysointi

Valitut mikrosatelliitit monistettiin polymeraasiketjureaktiolla. Jokaiselle mikrosatelliitille määritettiin julkaisuista saatujen tietojen sekä omien testiajajen perusteella alukkeen spesifinen kiinnittymislämpötila, jotka jaettiin neljään eri lämpötilaan; 50 °C, 54 °C, 58 °C ja 62 °C. PCR-tuotteen monistaminen aloitettiin kuumentamalla näytteitä neljän minuutin ajan 94°C:ssa, jolloin DNA-juosteet saatiin erilleen toisistaan. Tämän alkudenaturaation jälkeen seurasi alukkeiden liittäminen eli annealing-vaihe, joka sisälsi 30 kolmivaiheista kierrosta, joista ensimmäisessä vaiheessa DNA-juosteita denaturoitiin minuutin ajan. Toisessa vaiheessa lämpötila laskettiin minuutin ajaksi johonkin aiemmin mainituista neljästä lämpötilasta, jotta alukkeet voivat kiinnittyä toisiinsa. Kolmannessa vaiheessa lämpötila nostettiin minuutin ajaksi 72°C:een eli polymeraasin optimilämpötilaan, jonka aikana polymeraasientsyymi rakensi vapaista nukleotideista mallijuosteen perusteella DNA-juostetta. Pidentymisvaihe eli loppuelongaatio 72°C:essä kesti 10 minuuttia. Loppuelongaation tarkoituksena on varmistaa, että polymeraasi rakentaa kaikki aloitetut DNA-kopiot loppuun asti.

PCR-monistusta varten näytelevylle yhdistettiin DNA ja Master-mix-seos. Yhteen kaivoon pipetoitiin 3 µl DNA-eristettä ja 5 µl Master-mix-seosta, jonka koostumus oli seuraava: 1,75 µl ddH₂O, *Tbr*-polymeraasille sopivaa puskuria 0,60 µl, 0,5 µl dNTP-nukleotidiseosta, 0,05 µl kumpaakin aluketta, 2 µl leimaa (FAM, PET, VIC tai NED) ja 0,05 µl *Tbr*-polymeraasia (Dynazyme).

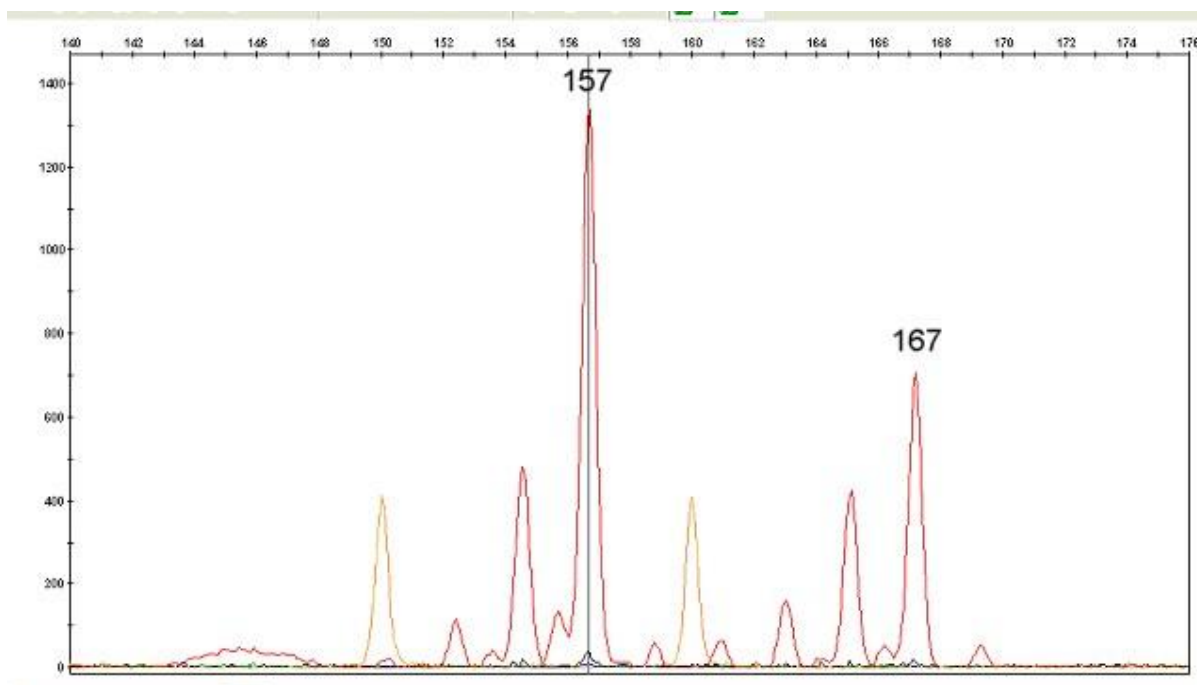
Valmiit PCR-tuotteet valmistettiin ABI3130-ajoa varten. Kokostandardi (15 µl) ja formamidi (1000 µl) sekoitettiin ja spinnattiin (1500 rpm/min) 1,5 ml:n eppendorffputkessa, jonka jälkeen se pipetoitiin ABI:n omalle 96- tai 384-levylle siten, että yhteen kaivoon tuli 1 µl PCR-tuotetta ja 10 µl kokostandardi-formamidiseosta. Levyn denaturointi tapahtui 94 °C:ssa 2-5 minuutin ajan, jonka jälkeen se jäädytettiin välittömästi jäällä tai PCR-laitteella 4 °C:een. Tämän jälkeen näytelevy siirrettiin ABI3130-DNA-analysointilaatuuriin, jossa DNA-fragmentit eroteltiin kapillaarielektroforeesilla.

Viiden M13-hännällistä leimaa käyttävän mikrosatelliitin PCR-monistus tapahtui Kotieläintieteen laitoksella, mutta ajo MTT:llä Jokioisilla käyttäen MegaBACE 500 DNA-analysointilaatua. Muiden merkkien osalta kaikki työvaiheet tehtiin Kotieläintieteen laitoksella.

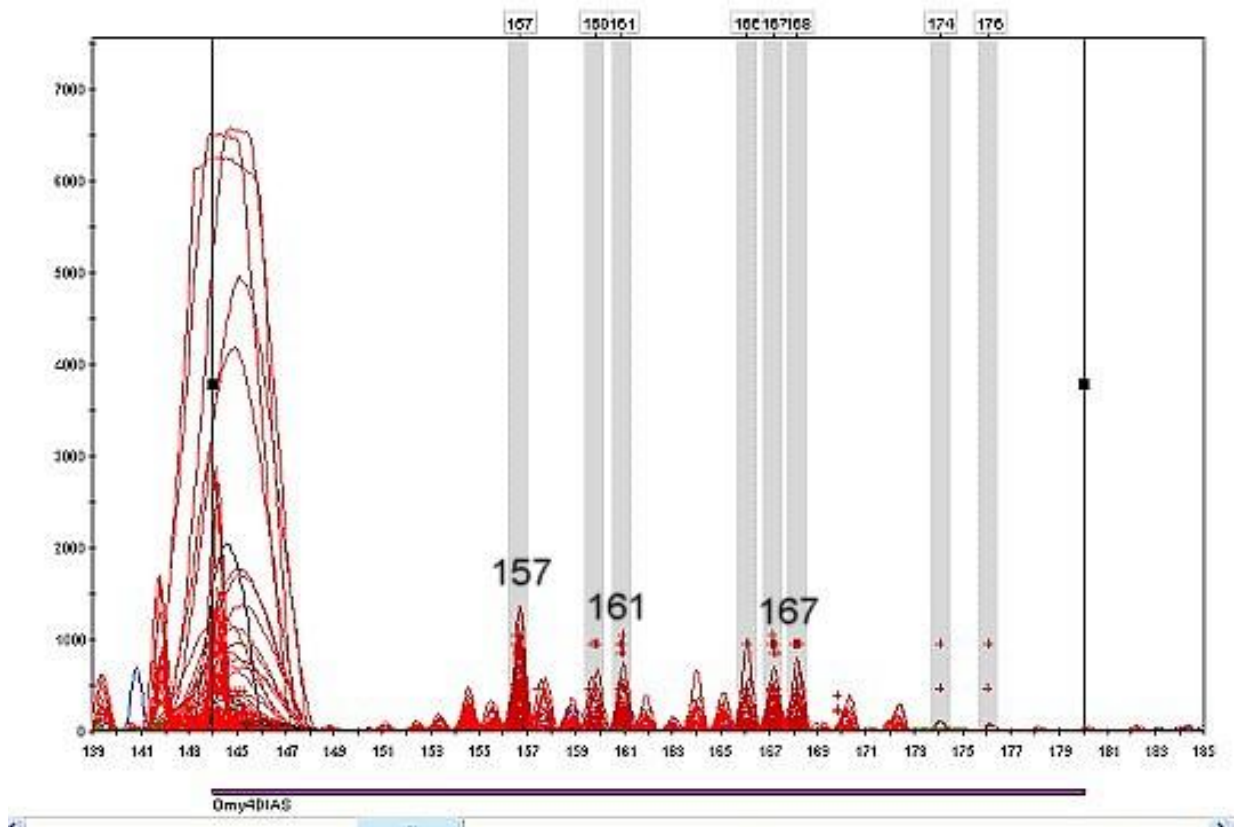
2.3.4 Näytteiden analysointi GeneMapper analyysiohjelmalla

ABI3130-DNA-analysointilaite tuottaa elektroferogrammin, josta yksilöiden genotyypit voidaan tulkita joko automaattisesti tai manuaalisesti. Genotyyppien määrittäminen tapahtui GeneMapper -analyysiohjelmalla, josta jokainen merkki luettiin enimmäkseen manuaalisesti (kuva 2).

GeneMapper -analyysiohjelman avulla saatuja F2-polven yksilöiden genotyyppijä verrattiin vanhempien genotyyppien kanssa, jotta tulosten oikeellisuus saatiin varmistettua. Vanhempien genotyypit oli määritetty ennen jälkeläisten genotyyppien määrittämistä. Osasta P- ja F1-polven näytteitä ei valitettavasti saatu tuloksia, joten vanhempien genotyypit pyrittiin päättämään jälkeläisten genotyyppien perusteella (kuva 3). Mendelistisyyden tarkastus tehtiin ensin manuaalisesti ja vielä uudelleen käyttämällä Perez-Enciso ym. (2005) kehittämää Atlas-ohjelmaa, joka tarkasti että jälkeläisten genotyypit vastasivat vanhempien genotyyppijä.



Kuva 2. Yksilön Omy4DIAS-merkillä saama genotyyppi 157/167.



Kuva 3. Omy4DIAS-merkin saamat genotyypit perheessä 804. F1-polven emä on genotyypistä 157/157 ja isä 161/167. F2-polven yksilöiden saamat alleelit näkyvät kolmen korkeimman piikin kohdalla, saaden alleelit 157, 161 ja 167.

2.4 Tilastolliset menetelmät

2.4.1. Käytetyt tilasto-ohjelmat

F2-polven yksilöiden genotyypitiedot tallennettiin GeneMapperilta Microsoft Excel- taulukkolaskentaohjelmaan, jossa tapahtui myös tietojen esikäsittely. SPSS Statistics 17.0 ohjelmalla F2-aineistosta suoritettiin ominaisuuksien tunnuslukujen laskenta ja F2-yksilöiden fenotyyppisten korrelaatioiden laskeminen. Tämän jälkeen ohjelmalla tehtiin mittaustulosten korjaus sukupuolen, sukukypsyuden ja kaihien suhteen, sekä varsinainen QTL-analyysi varianssianalyysillä käyttämällä korjattuja mittaustuloksia.

F2-polven mittaustuloksista poistettiin kiinteiden tekijöiden eli sukupuolen, sukukypsyyden ja kaihin vaikutus, jonka jälkeen varianssianalyysissä käytettiin selitettävänä muuttujana residuaaleja. Mittaustulosten korjauksessa käytettiin mallia

$$y_{ijkl} = \mu + \text{sukupuol}_{ij} + \text{sukuk}_{ik} + \text{kaihi}_{il} + e_{ijkl},$$

jossa y_{ijkl} = tutkittavan ominaisuuden arvo i:nällä yksilöllä

μ = populaation keskiarvo

$\text{sukupuol}_{ij=1,2}$ = sukupuolen vaikutus

$\text{sukuk}_{ik=0,1}$ = sukukypsyyden vaikutus

$\text{kaihi}_{il=0,1,2}$ = kaihin vaikutus

e_{ijkl} = jäännöstekijä.

2.4.2 Merkin ja tutkittavan ominaisuuden yhteyden analysointi

Varianssianalyysillä analysoimme onko tutkittavissa ominaisuuksissa tietyn merkin eri genotyyppien välillä tilastollisesti merkitseviä eroja. Varianssianalyysin avulla voidaan tutkia samanaikaisesti usean normaalisti jakautuneen populaation keskiarvojen välisiä eroja. Aineistossa esiintyvää vaihtelua kuvataan neliösummilla ja se hajotetaan eri lähteistä peräisin oleviin osiin. Testi perustuu luokittelevan muuttujan ryhmien keskiarvojen välisen vaihtelun vertaamiseen ryhmien sisäiseen vaihteluun. Tilastollisena testinä varianssianalyysissä käytetään ns. F-testiä, joka kertoo millä todennäköisyydellä nollahypoteesi ryhmäkeskiarvojen yhtäläisyydestä voidaan hylätä.

Tilastollinen testaaminen edellyttää, että populaatioiden jakaumat muistuttavat suurin piirtein normaalijakaumaa, eli ovat yksihuippuisia ja kohtalaisen symmetrisiä. Toinen varianssianalyysin edellytys on, että tutkittavan muuttujan varianssin on eri käsittelyissä oltava likimain samansuuruinen (Ranta ym. 2005). Varianssianalyysin aineistolle asettamat vaatimukset tarkastettiin ennen analyysia. Normaalisuus tarkastettiin Shapiro-Wilkin normaalisuustestillä sekä graafisesti histogrammeista ja varianssien yhtä suuruudet tarkastettiin käyttämällä Levenen testiä. Tilastollisesti merkitsevän yhteyden raja-arvona pidettiin p-arvoa $\leq 0,05$.

3. Tulokset ja niiden tarkastelu

3.1 Tutkittavien ominaisuuksien jakaumat ja tilastolliset tunnusluvut

Kalojen kokoa kuvaavat ominaisuudet pituus, paino ja filepaino oli mitattu jokaiselta F2-yksilöltä. Koko-ominaisuuksissa esiintyi suurta hajontaa. Kalojen painot vaihtelivat 395 g:sta 1635 g:aan, hajonnan ollessa 246 g (taulukko 4). Filepainossa vaihtelua esiintyi 220 g:sta 985 g:aan (hajonta 154 g) ja pituudessa pienimmän ja suurimman yksilön välinen ero oli 14 cm, hajonnan ollessa 2,8 cm. Sekä pituus että paino ovat normaalisti jakautuneita (kuvat 4 ja 5). Filepainon jakauma on muodoltaan hieman kolmihuippuinen (kuva 6), mutta kyseinen vähäinen poikkeama normaalijakaumasta ei vaikuta varianssianalyysin tulokseen.

Fileen väriä mittaavissa ominaisuuksissa vaihtelu oli suurinta värikylläisyydessä (taulukko 4), jossa pienin arvo oli 5 ja suurin 26, keskihajonnan ollessa 3,6. Suurin osa yksilöistä sijoittui kuitenkin lähelle keskiarvoa (16), joka voidaan havaita kuvasta 9. Rochessa suurimman ja pienimmän arvon välinen ero oli 14 yksikköä, hajonnan ollessa 2,2. Rochen kuvaajasta nähdään (kuva 7), että tulosten jakauma on vinoutunut oikealle eli populaatiossa on enemmän pieniä roche-arvoja saaneita yksilöitä kuin suuria roche-arvoja saaneita yksilöitä. Valoisuus saa arvoja välillä 29 - 47, keskihajonnan ollessa 2,9 ja keskiarvon 36. Valoisuuden saamat arvot ovat jakautuneet likimain normaalijakauman mukaisesti (kuva 8).

Taulukko 4. Kalan koko-ominaisuuksien ja fileen laatuominaisuuksien keskeiset tunnusluvut.

	pituus	paino	filepaino	roche	lave	cave
N	238	238	238	238	237	237
SE	1,801	15,948	9,993	0,145	0,186	0,233
std	27,8	246,0	154,2	2,2	2,9	3,6
min	350	395	220	19	29	5
maks	490	1635	985	33	47	26
ka	428	1024	617	28	36	16

N = havaintojen lukumäärä

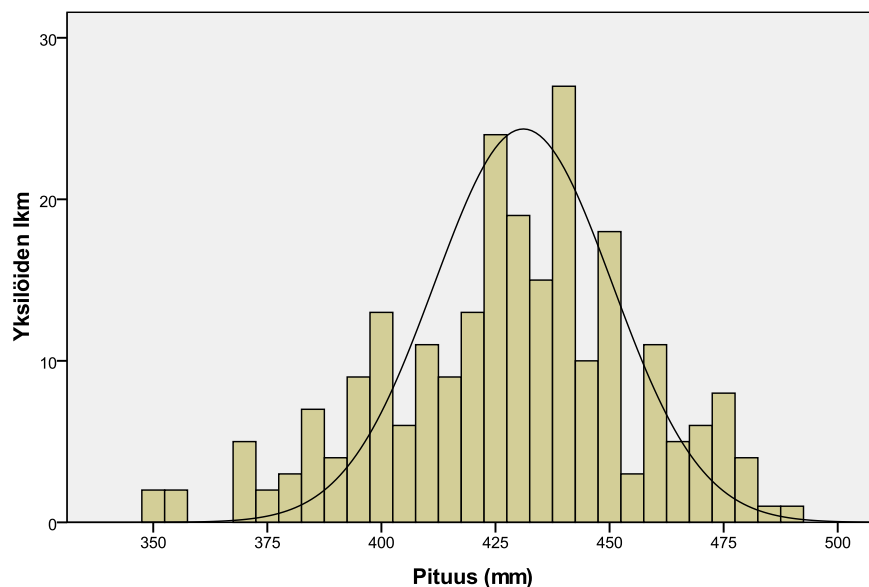
SE = keskivirhe

std = keskihajonta

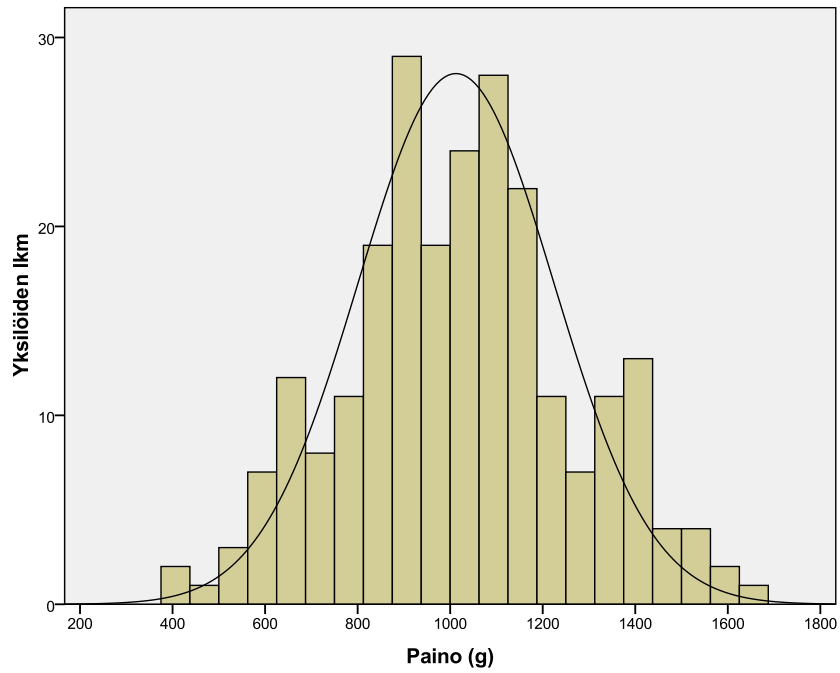
min= minimiarvo

maks = maksimiarvo

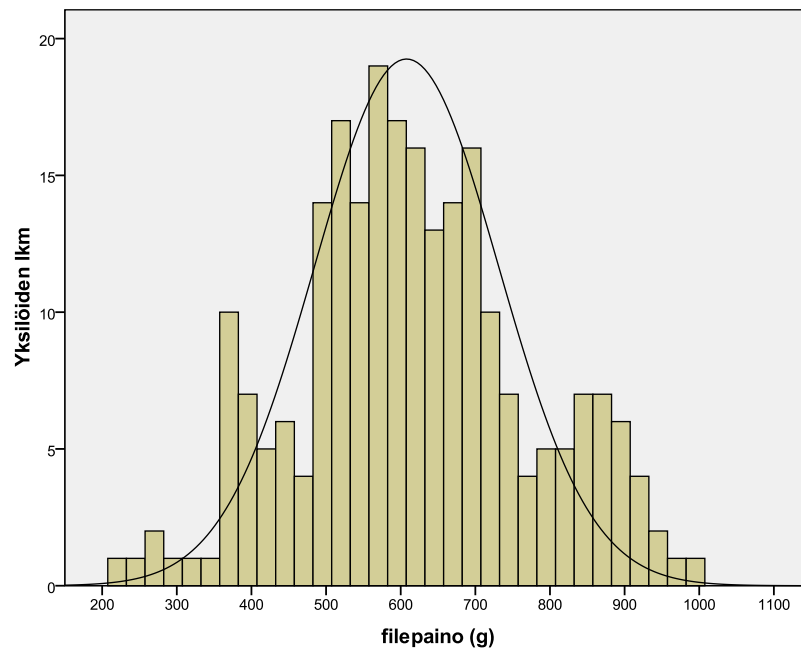
ka = keskiarvo



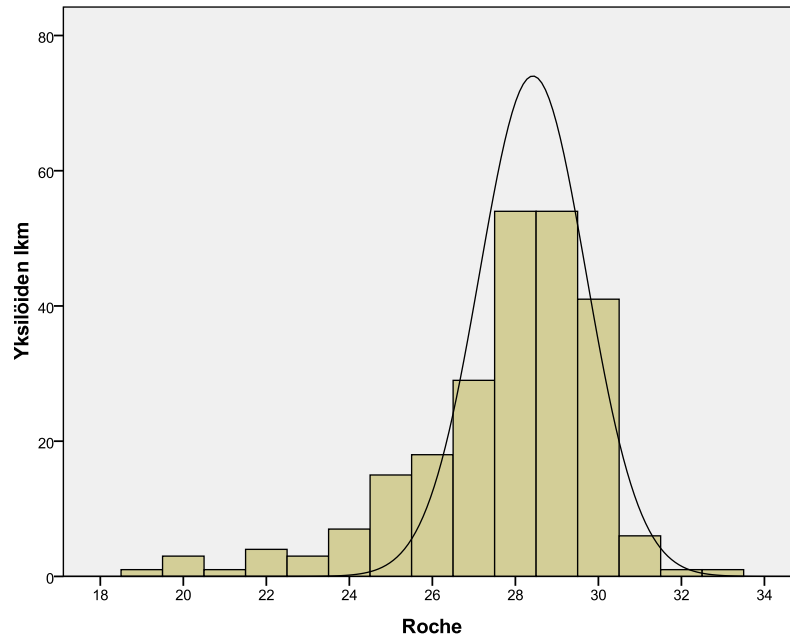
Kuva 4. F2-yksilöiden pituuden jakauma, sekä pituuden saamien arvojen normaalijakaumaa osoittava kuvaaja.



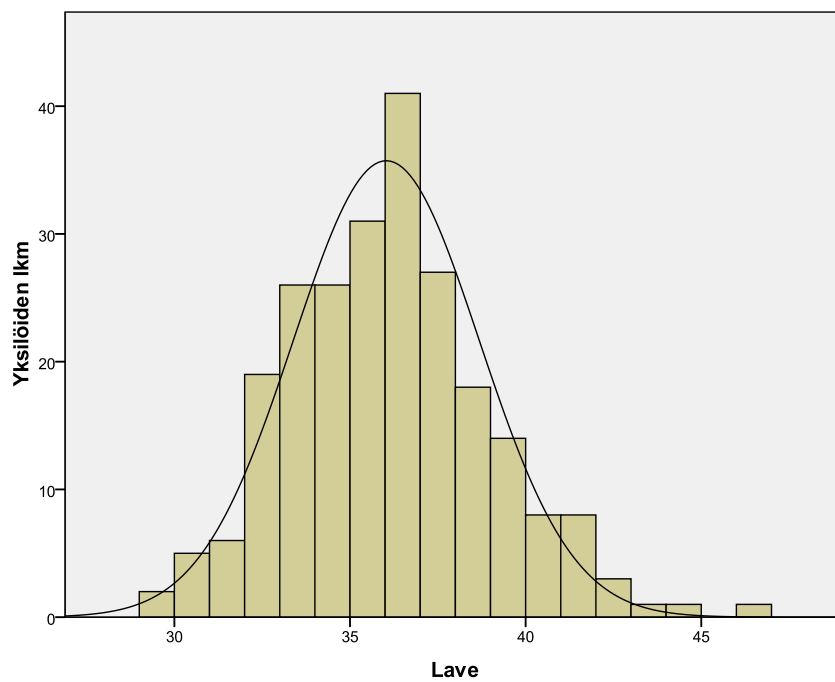
Kuva 5. F2-yksilöiden painon jakauma, sekä painon saamien arvojen normaalijakaumaa osoittava kuvaaja.



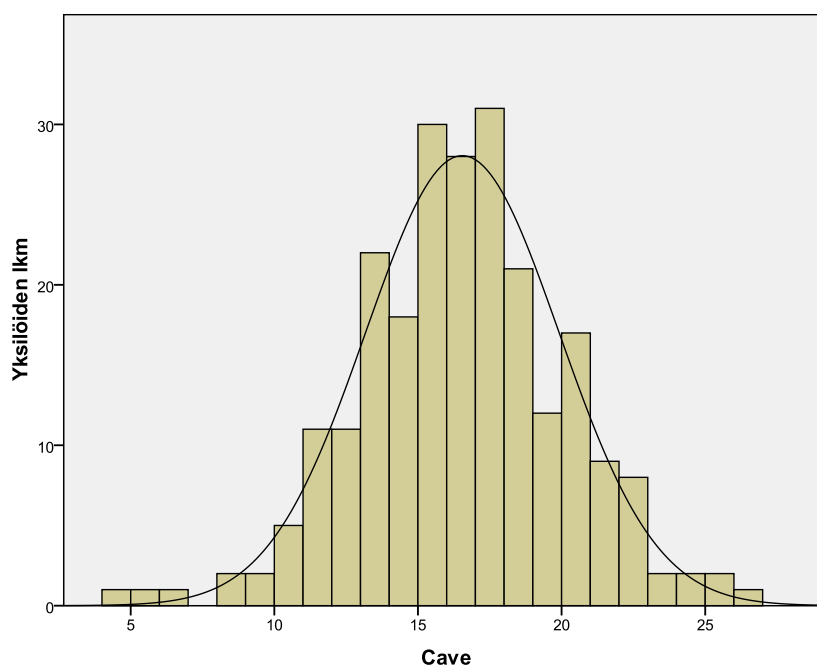
Kuva 6. F2-yksilöiden filepainon jakauma, sekä filepainon saamien arvojen normaalijakaumaa osoittava kuvaaja.



Kuva 7. F2-yksilöiden roche-arvojen jakauma, sekä rochen saamien arvojen normaalijakaumaa osoittava kuvaaja.



Kuva 8. F2-yksilöiden valoisuuden jakauma, sekä valoisuuden normaalijakaumaa osoittava kuvaaja.



Kuva 9. F2-yksilöiden värikylläisyyden jakauma, sekä värikylläisyyden normaalijakaumaa osoittava kuvaaja.

F2-polven eläimistä 79 oli koiraita ja 159 naaraita tai hyvin myöhään kypsyviä koiraita. Sukukypsiä oli 181 yksilöä ja sukukypsymättömiä 57 yksilöä. Sukukypsät jakautuivat siten, että 9 naarasta ja 48 koirasta olivat saavuttaneet sukukypsyyden. Suurin osa kaloista oli mittaushetkellä sukukypsymättömiä naaraita (150), kun taas sukukypsymättömiä oli koiraista alle puolet (31). Suurin osa kaloista oli terveitä (196), mutta 31 kalalla oli toinen ja 11 kalalla molemmat silmät kaihin samentamat (taulukko 5).

Taulukko 5. Kalan sukupuolen, sukukypsyyden ja kaihin keskeiset tunnusluvut.

	sukupuoli	sukukypsyyden	kaihi
N	238	238	238
Luokat			
0		181	196
1	79	57	31
2	159		11

N = havaintojen lukumäärä

Luokat; 0,1,2 = eläinten määrä kyseisessä luokassa

Sukupuolten väliset erot olivat pieniä ja samansuuntaisia kaikissa kolmessa kokoominaisuudessa (taulukko 6), joissa kaikissa koiraiden saama keskiarvo oli hieman suurempi kuin naaraiden ja sukukypsymättömien koiraiden. Luonnossa elävien lohikalojen koiraat joutuvat kilpailemaan pariutumismahdollisuuksista ja luonnonvalinta suosii suurikokoisia koiraita. Naaraiden kokoon ei kohdistu vastaavaa valintaa, joten erilaiset valintapaineet ovat johtaneet sukupuolten välisiin kokoeroihin (Gross 1985, Fleming & Gross, 1994). Fileen värissä ero sukupuolten välillä oli vähäinen (taulukko 7). Sukupuolen vaikutuksesta fileen väriin löytyy vaihtelevia tuloksia. Kause ym. (2002) eivät havainneet sukupuolella olevan vaikutusta lihan punaisuuden kanssa, toisin kuin Gjerde (1989). Sukukypsien yksilöiden

keskiarvo oli hieman suurempi kaikissa kolmessa koko-ominaisuudessa kuin sukukypsytettömien, mutta fileen värissä sukukypsyys ei aiheuttanut juuri eroa keskiarvojen välille. Painoon ja kokoon liittyvien ominaisuuksien (mm. filepaino) on havaittu olevan korkeampia koirilla kuin naarilla, sukukypsytettömien yksilöiden saadessa alhaisimmat arvot (Kause ym. 2002). Gjerden (1986) mukaan lohikaloilla sukukypsytettömät yksilöt ovat kooltaan pienempiä, sillä kookkaammat yksilöt tulevat nopeammin sukukypsäksi.

Kaihi vaikutti koko-ominaisuuksiin alentavasti. Terveiden yksilöiden keskiarvo oli suurempi kuin toiselta silmältä kaihin vaivaamien yksilöiden, joiden keskiarvo oli korkeampi kuin molemmista silmistään kaihisten yksilöiden. Kuukan ym. (2010) mukaan on todennäköistä, että terveysilmäisten yksilöiden valinta nopeuttaisi kasvua. Fileen värissä roche-värikortilla mitatut arvot noudattivat samaa kaavaa kuin koko-ominaisuudet, mutta valoisuuteen kaihi ei vaikuttanut. Värikylläisyys oli alhaisempi molemmista silmistään kaihisilla yksilöillä kuin terveillä yksilöillä.

Taulukko 6. Kalan koko-ominaisuuksien jakautuminen kiinteiden tekijöiden (sukupuoli, sukukypsyys ja kaihi) luokkiin, niiden väliset keskiarvot (ka), sekä keskihajonnat (sd).

	Luokka	N	Pituus		Paino		Filepaino	
			ka	sd	ka	sd	ka	sd
Sukupuoli	1	79	436,5	29,6	1096,7	258,3	646,0	158,4
	2	159	423,9	26,0	988,1	232,2	602,0	150,4
Sukukypsyys	0	181	423,1	26,3	978,5	228,3	596,1	149,0
	1	57	444,0	26,4	1169,0	246,0	681,7	153,5
Kaihi	0	196	432,6	25,8	1062,5	230,9	640,5	145,1
	1	31	412,9	26,9	896,8	229,1	536,8	141,5
	2	11	391,4	24,0	699,6	206,6	415,0	130,8

Taulukko 7. Fileen väriin liittyvien ominaisuuksien jakautuminen kiinteiden tekijöiden (sukupuoli, sukukypsyys ja kaihi) luokkiin, niiden väliset keskiarvot (ka), sekä keskihajonnat (sd).

	Luokka	N	Roche		Lave		Cave	
			ka	sd	ka	sd	ka	sd
Sukupuoli	1	79	27,5	2,3	37,2	3,2	16,8	3,8
	2	159	27,9	2,2	35,6	2,5	16,3	3,5
Sukukypsyys	0	181	27,9	2,2	35,6	2,5	16,1	3,5
	1	57	27,5	2,3	37,8	3,2	17,6	3,7
Kaihi	0	196	28,0	2,0	36,1	2,8	16,7	3,4
	1	31	27,1	2,6	36,0	2,9	16,1	4,5
	2	11	25,2	3,2	36,8	3,4	13,5	4,1

3.2 Tutkittavien ominaisuuksien väliset korrelaatiot

Pituuden ja painon välillä havaittiin voimakas positiivinen yhteys ($r = 0,930$), kuten luonnollisesti painolla ja filepainolla ($0,988$), sekä pituudella ja filepainolla ($0,920$) (taulukko 8). Kause ym. (2007a) havaitsivat painon ja filepainon välillä voimakkaan positiivisen fenotyyppisen ($0,93$) ja geneettisen ($0,96 \pm 0,02$) korrelaation. Ominaisuuksien väliset fenotyyppiset korrelaatiot syntyvät ympäristön ja geneettisten tekijöiden yhteisvaikutuksesta

(Lynch & Walsh 1998). Morfologisten ominaisuuksien (esim. pituus ja leveys) välisten geneettisten korrelaatioiden on havaittu olevan korkeimpia kaikista ominaisuuksien välisistä yhdistelmistä (Roff 1997). Tämän voidaan olettaa johtuvan siitä, että näiden ominaisuuksien on oltava toiminnallisesti ja/tai kehityksellisesti yhteensopivia.

Taulukko 8. F2-yksilöiden ominaisuuksien väliset fenotyypiset korrelaatiot.

	sukuk.	kaihi	pituus	paino	filep.	roche	lave
kaihi	-0,090						
pituus	0,323**	-0,376**					
paino	0,331**	-0,368**	0,930**				
filep.	0,237**	-0,366**	0,920**	0,988**			
roche	-0,080	-0,284**	0,543**	0,548**	0,580**		
lave	0,323**	0,030	-0,117	-0,112	-0,165*	-0,465**	
cave	0,181**	-0,167**	0,526**	0,550**	0,535**	0,579**	-0,315**

sukuk. = sukukypsyys, filep. = filepaino

** $p \leq 0,01$; * $p < 0,05$

Fileen väriä mittaava roche korreloi kaikkien kolmen koko-ominaisuuden kanssa tilastollisesti merkitsevästi, saaden pituuden (0,543), painon (0,548) ja filepainon (0,580) kanssa samansuuntaiset ja lähes identtiset arvot. Värikylläisyyttä kuvaava cave saa hyvin samanlaisia tilastollisesti merkitseviä arvoja kuin rochekin, sillä värikylläisyyden korrelaatio pituuden (0,526), painon (0,550) ja filepainon (0,535) kanssa eroaa vain hieman rochen ja koko-ominaisuuksien välisistä korrelaatioista. Valoisuutta kuvaava lave saa alhaisia negatiivisia arvoja koko-ominaisuuksien kanssa, mutta filepainon välinen korrelaatio (-0,165) on ainoa tilastollisesti merkitsevä tulos, joka sekin on vain suuntaa antava. Korrelaatioiden perusteella voidaankin olettaa, että kalan koon kasvaessa fileen väri muuttuu kylläisemmäksi. Tämä on ollut huomattavissa kirjolohen valintajalostuksessa, jossa nopeimmin kasvavien JALO-kalojen lihan väri on hitaammin kasvavien kalojen lihaa värikylläisempää (Kause ym. 2002).

Fileen väriä kuvaavat muuttujat roche, lave ja cave korreloivat keskenään tilastollisesti merkitsevästi. Haluttu fileen väri liittyy matalaan valoisuuteen ja kylläiseen väriin eli korkeaan chroman arvoon, jotka korreloivat keskenään negatiivisesti (-0,315). Kause ym. (2008) saivat tutkimuksessaan samansuuntaisen korrelaation värikylläisyydelle ja valoisuudelle ($r \leq -0,48$). Suuret roche-arvot saa halutun värinen liha, joka korreloi positiivisesti värikylläisyyden kanssa (0,579), mutta värikylläisyyden tavoin negatiivisesti valoisuuden kanssa (-0,465). Korrelaatiot ovat samansuuntaisia muissakin punalihaisilla lohikaloilla tehdyissä tutkimuksissa (Marty-Mahé ym. 2004, Kause ym. 2008).

Sukukypsyys korreloi positiivisesti ja tilastollisesti merkitsevästi koko-ominaisuuksien, sekä valoisuuden että värikylläisyyden kanssa, saaden arvoja välillä 0,181 – 0,331. Keskiarvoja vertailtaessa havaittiin sukukypsien olevan kookkaampia kuin sukukypsymättömät yksilöt, jota korrelaatio puoltaa.

Kaihi korreloi negatiivisesti ja tilastollisesti merkitsevästi kaikkien muiden ominaisuuksien paitsi valoisuuden kanssa, arvojen jakautuessa – 0,167 ja – 0,376 välille. Korrelaatioiden perusteella voidaan tehdä sama oletus mikä aiemmin keskiarvoja vertailemalla havaittiin, eli

kaihistä kärsivät yksilöt ovat kooltaan pienempiä, oletettavasti koska kaihi heikentää kalan elinvoimaa huonontamalla sen ravinnonsaantia. Toisaalta on myös mahdollista, että pienemmät yksilöt ovat alttiimpia sairastumaan kaihiin. Pienemmällä yksilöllä fileen väri on vaaleampi, eikä yhtä täyteläisen punainen kuin on toivottua. Kuukka ym. (2006) havaitsivat viljelyillä lohikaloilla joitakin positiivisia ja joitakin negatiivisia korrelaatioita kaihiluokan ja kalan pituuden välillä. Suurimmassa osassa parvista tilastollisesti merkitsevää suhdetta ei kuitenkaan havaittu.

3.3 Genotyyppiaineiston tarkastelu

Genotyyppiaineisto koostui neljän perheen GeneMapperilta saaduista genotyypeistä jokaisella mikrosatelliitilla. Alleelien lukumäärät vaihtelivat merkeittäin yhdestä neljään, genotyyppien määrän vaihdellessa yhdestä viiteen (taulukko 9). Alleelien lukumäärien keskiarvo merkkiä kohden oli kolme alleelia, kuten genotyyppien määrä perheittäin. Genotyyppien keskiarvo koko aineistossa oli myös kolme genotyyppiä.

Muuntelu oli suurinta merkeillä One107ADFG ja Ots513NWFSC, joilla oli jokaisella perheellä neljä alleelia. Vähiten muuntelua esiintyi merkin OmyRGT3TUF genotyypeissä, jossa alleelien keskiarvo perhettä kohden oli 1,5. Perheissä 804 ja 837 genotyypit muodostuivat yhdestä alleelistä, eli yksilöt olivat kaikki homotsygootteja. Perheissä 808 ja 834 oli kummassakin kaksi alleelia, joten joitakin heterotsygootteja yksilöitä löytyi. Muuntelu oli kuitenkin hieman suurempaa, kuin mitä alleelien ja genotyyppien lukumäärien tarkastelu osoittaa. Perheiden välillä esiintyi vaihtelua alleelien suhteen ja esimerkiksi edellä mainitussa merkissä OmyRGT3TUF kyse oli kolmesta eri alleelistä, joiden esiintyminen vaihteli perheittäin.

Yhdeksälle merkille ei saatu joissakin perheissä tulosta ollenkaan, eli genotyypit eivät monistuneet ja jäivät kokonaan puuttumaan. Perheessä 804 ei saatu tulosta merkillä OmyRGT28TUF. Perheessä 808 genotyypit jäivät monistumatta merkeillä Omm1117, Omy9DIAS, Omy1000UW, Omy1090UW, Omy1212UW ja OmyRGT9TUF. Perheessä 834 tulokset puuttuivat merkeiltä Omm1359 ja Omy1119UW. 837 perheen osalta genotyyppiaineistossa oli puuttuvia tuloksia vain yksilötasolla, sillä genotyypit monistuivat jokaisella merkillä normaalisti.

Taulukko 9. Alleelien ja genotyyppien lukumäärät perheittäin, sekä alleelien määrien keskiarvo/mikrosatelliitti.

Perhe	804 Alleel. lkm	804 Genot. lkm	808 Alleel. lkm	808 Genot. lkm	834 Alleel. lkm	834 Genot. lkm	837 Alleel. lkm	837 Genot. lkm	Alleel. lkm ka
Ogo1UW	4	4	3	4	3	4	3	2	3,4
Omm1009	3	4	3	4	4	4	4	4	3,8
Omm1046	2	3	3	4	3	4	4	4	3,4
Omm1117	2	3	-	-	3	2	3	2	2,5
Omm1359	2	3	2	3	-	-	2	2	2,3
Omm1360	3	4	4	4	4	2	2	2	3,1
Omm1362	2	2	2	2	3	3	3	4	2,6
Omm1364	2	3	2	3	4	4	3	4	3,1
Omy4DIAS	3	3	3	2	2	3	3	4	2,9
Omy7INRA	3	2	2	2	3	4	3	4	2,9
Omy9DIAS	2	2	-	-	2	3	2	3	2,3
Omy1000UW	3	4	-	-	4	5	4	4	3,0
Omy1006UW	2	3	2	2	2	3	3	4	2,6
Omy1011UW	4	4	4	4	2	3	2	2	3,1
Omy1090UW	3	4	-	-	3	4	3	4	3,5
Omy1119UW	2	3	2	3	-	-	2	3	2,5
Omy1191UW	4	4	4	4	3	4	3	4	3,8
Omy1212UW	3	4	-	-	2	2	2	3	2,7
OmyRGT3TUF	1	1	2	2	2	2	1	1	1,5
OmyRGT8TUF	2	3	3	4	3	4	3	4	3,3
OmyRGT9TUF	2	2	-	-	2	2	2	2	2,0
OmyRGT12TUF	2	3	3	2	4	2	4	4	3,0
OmyRGT19TUF	4	4	4	4	3	4	3	3	3,6
OmyRGT28TUF	-	-	2	2	2	2	2	2	2,0
OmyRGT34TUF	4	4	3	4	4	4	4	4	3,9
One6ASC	3	4	4	4	3	4	2	3	3,4
One107ADFG	4	4	4	4	4	4	4	4	4,0
Ots513NWFSC	4	4	4	4	4	4	4	4	4,0
Ots517NWFSC	4	4	4	4	3	4	3	4	3,8
Ots522NWFSC	3	3	4	4	3	3	3	4	3,4
SSOSL32	3	2	2	3	3	4	3	5	3,1

3.4 Tutkittavien ominaisuuksien ja mikrosatelliittien väliset tilastolliset yhteydet

QTL-analyysi suoritettiin aineistolla, jossa kiinteiden tekijöiden eli sukupuolen, sukukypsyyden ja kaihin vaikutus oli poistettu. Perhe ei ollut analyysissa mukana kiinteänä tekijänä, sillä se olisi korjannut liikaa ominaisuuden ja genotyypin välistä vaihtelua. Koska perheet kasvatettiin samassa ympäristössä, voidaan perheiden välisten erojen olettaa olevan geneettisiä. Pienissä populaatioissa sattumalla on suuri vaikutus joten tulee ottaa huomioon, että jossakin perheessä voi olla sattumalta yleistynyt ominaisuuteen vaikuttava alleeli.

Jokaiselle tutkittavalle ominaisuudelle löytyi tilastollisesti erittäin merkitsevä ($p < 0,001$) yhteys useamman mikrosatelliitin ja genotyypin välillä, joten voidaan olettaa, että kyseisen

merkin kanssa samassa kytkentäryhmässä on yksi tai useampia QTL:ia (taulukot 10 ja 11). Lisäksi löydettiin useita tilastollisesti merkitseviä ($p < 0,01$), sekä joitakin suuntaa antavia ($p < 0,05$) ominaisuuden ja genotyypin välisiä yhteyksiä.

Yhden merkin analyysissa tilastollisten testien lukumäärä on suuri ja testien lukumäärän kasvaessa väärin positiivisten tulosten eli hyväksymisvirheen määrä lisääntyy. Sidakin-korjaus (Sidak, 1967) on monivertailujen yhteydessä käytetty p-arvojen korjausmenettely, jonka tavoitteena on säilyttää alkuperäinen tilastollinen merkitsevyystaso suunnitellun suuruisena monivertailuista huolimatta. Sidakin korjauksella korjattu p-arvo saadaan kertomalla testin antama p-arvo testien lukumäärällä. Korjaus olettaa testien olevan toisistaan riippumattomia. Koska tutkittavissa ominaisuuksissa on kyse enemminkin kahdesta toisistaan riippumattomasta kolmen tutkittavan ominaisuuden ryhmästä kuin kuudesta toisistaan riippumattomasta ominaisuudesta, otettiin tämä huomioon testien määrää laskettaessa. Riskitasoksi valittiin 5 % (p) ja koska meillä on kaksi toisistaan riippumatonta ominaisuutta ja 31 mikrosatelliittia (Nt), saatiin tutkimuskohtainen riskitaso (p') laskettua kaavalla

$$p' \leq 1 - (1 - p)^{1/Nt} = p' \leq 1 - (1 - 0,05)^{(1 / (2 * 31))} \approx 0,0082$$

Tällöin 62:n toisistaan riippumattoman testin tilanteessa 5 %:n riskitasoa vastaa $p \leq 0,0082$. Jotta moninkertainen testaaminen saataisiin huomioitua, otetaan tuloksissa huomioon $p \leq 0,0082$ riskitason alittavat F-arvot.

3.4.1 Koko-ominaisuudet

Tulosten perusteella kalan kokoon vaikuttavia QTL-alueita, jotka vaikuttivat sekä pituuteen, painoon että filepainoon, löydettiin yhdeksästä eri kytkentäryhmästä (1, 7, 8, 11, 15, 17, 24, 29 ja 31) (taulukko 10). Viidestä kytkentäryhmästä löytyi QTL, joka sai riskitason alittavia F-arvoja ($P < 0,001$) kaikilla kolmella koko-ominaisuudella. Niitä olivat kytkentäryhmään 1 kytkeytynyt merkki Ots517NWFSC, kytkentäryhmään 7 kytkeytynyt merkki Omy7INRA, kytkentäryhmässä 11 merkki SSOSL32, kytkentäryhmään 15 kytkeytynyt OmyRGT8TUF sekä OmyRGT19TUF kytkentäryhmässä 29. Edellä mainituista kytkentäryhmistä on löydettävissä kalan kokoon ja lihasmassaan vaikuttavia suurivaikutteisia lokuksia.

Neljässä kytkentäryhmässä havaittiin riskitason alittavia F-arvoja, joissa pituuden osalta tilastollinen merkitsevyys jäi hieman alhaisemmaksi kuin painolla ja filepainolla. Kytkentäryhmässä 8 mikrosatelliitti Omm1009 sai pituudelle F-arvon 3,265 ($P = 0,002$), painon saadessa F-arvon 5,562 ($P < 0,001$) ja filepainon F-arvon 5,605 ($P < 0,001$).

KytKentäryhmään 11 kytkeytynyt toinen mikrosatelliitti Omy1011UW, sai hieman suuremman tilastollisen merkitsevyyden pituudelle ($F = 3,647$ ja $P = 0,002$), kuin paino ($F = 4,878$ ja $P < 0,001$) ja filepaino ($F = 5,225$ ja $P < 0,001$). Molemmat kytkentäryhmään 11 kytkeytyneet merkit alittivat valitun riskitason, joten voidaan olettaa, että kyse on samasta kalan kokoon vaikuttavasta QTL:sta.

KytKentäryhmässä 17 merkki Omm1360 sai pituudelle F-arvon 2,869 riskitasolla $P = 0,007$. Paino sai F-arvon 4,680 riskitasolla $P < 0,001$ ja pituus F-arvon 5,231 riskitasolla $P < 0,001$. Toinen samaan kytkentäryhmään kytkeytyneistä merkeistä ei saanut kalan pituudelle riskitasoa alittavaa tulosta, toisin kuin painolle ja filepainolle.

KytKentäryhmässä 24 mikrosatelliitti Omy4DIAS sai pituudelle F-arvon 4,181 (P = 0,001), painolle F = 6,592 (P <0,001) ja filepainolle F = 7,106 (P <0,001). KytKentäryhmään 31 kytketty Omy1006UW sai samat riskitason alittavat tilastolliset merkitsevyydet näille ominaisuuksille, pituuden saadessa F-arvon 4,575, painon F = 7,013 ja filepainon 7,692.

Yhtään pelkästään pituuteen liittyvää suurivaikutteista lokusta ei havaittu, kuten ei myöskään pituuteen ja painoon tai pituuteen ja filepainoon liittyvää QTL:sta. Pituuteen liittyvä QTL vaikutti siis jokaisessa kromosomissa sekä painoon että filepainoon. Kause ym. havaitsivat (2007b) lohikaloilla vahvan geneettisen yhteyden kalan suuren koon ja kasvaneen rasvapitoisuuden välillä. Suuri rasvapitoisuus vaikuttaa heikentävästi fileen laatuun, mutta sitä voidaan kontrolloida ravinnon matalalla rasvapitoisuudella ja korkealla proteiinipitoisuudella.

Taulukko 10. Mikrosatelliitit ja niiden kytKentäryhmät Nichols ym. (2003) mukaan, sekä varianssianalyysin F-arvot ja tilastolliset merkitsevyydet kalan pituutta, painoa ja filepainoa kuvaavissa muuttujissa.

	KytKentäryhmä Nichols. ym.2003 mukaan	Pituus		Paino		Filepaino	
		P-arvo	F-arvo	P-arvo	F-arvo	P-arvo	F-arvo
Ots517NWFSC	OA-I 1	<0,001 ***	3,396	<0,001 ***	5,059	<0,001 ***	5,427
Ogo1UW	OA-III 3	0,026 *	2,600	0,010 *	3,117	0,005 **	3,455
One6ASC	OA-IV 4	0,016 *	2,411	0,010 *	2,607	0,004 **	2,899
One107ADFG	OA-V 5	0,039 *	2,074	<0,001 ***	4,383	<0,001 ***	4,931
Omm1046	OA-VI 6	0,048 *	1,997	<0,001 ***	3,907	<0,001 ***	4,286
Omm1359	OA-VI 6					0,041 *	2,655
Omy7INRA	OA-VII 7	<0,001 ***	3,708	<0,001 ***	6,621	<0,001 ***	7,103
Omm1009	OA-VIII 8	0,002 **	3,265	<0,001 ***	5,562	<0,001 ***	5,605
Ots513NWFSC	OA-X 10	0,009 **	2,968	<0,001 ***	5,553	<0,001 ***	6,118
SSOSL32	OA-XI 11	<0,001 ***	3,647	<0,001 ***	5,312	<0,001 ***	5,731
Omy1011UW	OA-XI 11	0,002 **	3,170	<0,001 ***	4,878	<0,001 ***	5,225
OmyRGT3TUF	OA-XII 12					0,027 *	3,680
OmyRGT8TUF	OA-XV 15	<0,001 ***	4,387	<0,001 ***	5,156	<0,001 ***	5,616
Omm1117	OA-XVII 17			0,005 **	3,874	0,006 **	3,745
Omm1360	OA-XVII 17	0,007 **	2,869	<0,001 ***	4,680	<0,001 ***	5,231

OmyRGT12TUF	OA-XVIII 18			0,001 **	4,514	<0,001 ***	4,877
Omy1191UW	OA-XIX 19			<0,001 ***	3,947	<0,001 ***	4,024
Omy1090UW	OA-XXI 21	0,030 *	2,192	0,002 **	3,196	0,001 **	3,367
Omm1362	OA-XXII 22	0,032 *	3,002	0,001 **	5,857	<0,001 ***	6,843
Omy9DIAS	OA-XXII 22	0,017 *	3,121	0,001 **	4,988	0,001 **	4,892
Ots522NWFSC	OA-XXIII 23			0,042 *	2,334	0,033 *	2,461
Omy4DIAS	OA-XXIV 24	0,001 **	4,181	<0,001 ***	6,592	<0,001 ***	7,106
Omm1364	OA-XXVII 27	0,009 **	3,172	<0,001 ***	5,166	<0,001 ***	5,158
OmyRGT19TUF	OA-XXIX 29	<0,001 ***	5,957	<0,001 ***	10,181	<0,001 ***	10,398
OmyRGT34TUF	OA-XXX 30	0,041 *	2,000	<0,001 ***	3,659	<0,001 ***	3,868
Omy1006UW	OA-XXXI 31	0,001 **	4,575	<0,001 ***	7,013	<0,001 ***	7,692

*** $p < 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p < 0,05$

Painoon ja filepainoon liittyviä QTL-alueita löytyi kymmenestä kytkentäryhmästä (5, 6, 10, 17, 18, 19, 21, 22, 27 ja 30). Kytkentäryhmässä 5 merkki One107ADFG sai molemmille ominaisuuksille saman riskitason alittavan merkitsevyyden ($P < 0,001$) painon saadessa F-arvon 4,383 ja filepainon $F = 4,931$. Samalla riskitasolla havaittiin QTL-alue kytkentäryhmässä 6 merkillä Omm1046 (paino $F = 3,907$, filepaino $F = 4,286$), kytkentäryhmässä 10 merkillä Ots513NWFSC (paino $F = 5,553$, filepaino $F = 6,118$), kytkentäryhmässä 19 merkillä Omy1191UW (paino $F = 3,947$, filepaino $F = 4,024$), kytkentäryhmässä 27 merkillä Omm1364 (paino $F = 5,166$, filepaino $F = 5,158$) ja kytkentäryhmässä 30 merkillä OmyRGT34TUF (paino $F = 3,659$, filepaino $F = 3,868$).

Kytkeentäryhmään 17 kytkeytynyt merkki Omm1117 alitti riskitason painon saadessa $F = 3,874$ ($P = 0,005$) ja filepainon $F = 3,745$ ($P = 0,006$). Toisen tähän kytkentäryhmään kytkeytyneen merkin havaittiin liittyvän QTL-alueeseen, joka vaikutti sekä kalan kokoon että lihasmassaan. Kytkentäryhmän 18 merkki OmyRGT12TUF alitti riskitason saaden painolle F-arvon 4,514 ($P = 0,001$) ja filepainolle F-arvon 4,877 ($P < 0,001$). Omy1090UW:n havaittiin kytkentäryhmässä 21 kytkeytyneen QTL-alueeseen, sillä paino sai F-arvon 3,196 ($P = 0,002$) ja filepaino F-arvon 3,367 ($P = 0,001$). Kytkentäryhmässä 22 molemmat merkit liittyivät kalan lihasmassaan liittyvään QTL-alueeseen, sillä merkki Omm1362 sai painolle $F = 5,857$ ($P = 0,001$) ja filepainolle $F = 6,843$ ($P < 0,001$) ja Omy9DIAS painolle $F = 4,988$ ($P = 0,001$) ja filepainolle $F = 4,892$ ($P = 0,001$). Filepaino oli ainoa kalan koko-ominaisuus, jolle löytyi pelkästään kyseiseen ominaisuuteen vaikuttavat kaksi QTL:sta. Kytkentäryhmässä 3 mikrosatelliitti Ogo1UW sai F-arvon 3,455 ($P = 0,005$) ja kytkentäryhmässä 4 merkki One6ASC F-arvon 2,899 ($P = 0,004$).

3.4.2 Fileen väriin liittyvät ominaisuudet

Fileen väriin vaikuttavia QTL-alueita löytyi useita (taulukko 11). Viidestä kytkentäryhmästä (1, 11, 12, 18 ja 30) löydettiin QTL, joka vaikutti sekä rocheen, fileen värin valoisuuteen että värikylläisyyteen. Kytkeäryhmässä 1 merkki Ots517NWFSC alitti riskitason saaden rochelle $F = 4,158$ ($P < 0,001$), valoisuudelle $F = 3,406$ ($P < 0,001$) ja värikylläisyydelle $F = 2,626$ ($P = 0,004$). Kytkeäryhmässä 12 OmyRGT3TUF sai riskitason alittavat arvot rochelle $F = 6,764$ ($P = 0,001$), valoisuudelle $F = 9,315$ ($P < 0,001$) ja värikylläisyydelle $F = 5,029$ ($P = 0,007$). Kytkeäryhmässä 18 merkki OmyRGT12TUF sai rochelle $F = 3,958$ ($P = 0,002$), valoisuudelle $F = 4,615$ ($P < 0,001$) ja värikylläisyydelle $F = 3,518$ ($P = 0,004$) valitun riskitason alittavat arvot. Myös kytkentäryhmässä 30 merkki OmyRGT34TUF alitti riskitason, sillä roche sai F -arvon $4,153$ ($P < 0,001$), valoisuus F -arvon $4,307$ ($P < 0,001$) ja värikylläisyys F -arvon $2,605$ ($P = 0,007$).

Kytkeäryhmässä 11 merkki SSOSL32 paljasti QTL:n, joka vaikutti sekä rocheen ($F = 3,779$, $P < 0,001$), valoisuuteen ($F = 4,278$, $P < 0,001$) että värikylläisyyteen ($F = 2,672$, $P = 0,005$). Samaan kytkentäryhmään liittyvä toinen merkki Omy1011UW alitti riskitason vain rochen ja valoisuuden osalta, saaden rochelle F -arvon $3,929$ ($P < 0,001$) ja valoisuudelle F -arvon $4,263$ ($P < 0,001$). Kytkeäryhmässä voi esiintyä kaksi QTL:sta, joiden on mahdollista vaikuttaa fileen väriin kahdella eri tavalla. Kytkeäryhmässä voi olla QTL, joka vaikuttaa samanaikaisesti rocheen ja valoisuuteen, sekä toinen vain värikylläisyyteen vaikuttava QTL, tai rocheen, valoisuuteen ja värikylläisyyteen vaikuttava QTL, sekä toinen rocheen ja valoisuuteen vaikuttava QTL.

Rocheen ja valoisuuteen vaikuttava QTL havaittiin kahdesta kytkentäryhmästä. Edellä mainitun kytkentäryhmään 11 liittyvän merkin (Omy1011UW) lisäksi kytkentäryhmässä 5 merkki One107ADFG alitti tutkimuskohtaisen riskitason saaden rochelle F -arvon $3,521$ ($P = 0,001$) ja valoisuudelle F -arvon $2,738$ ($P = 0,007$). Valoisuuteen ja värikylläisyyteen vaikuttava suurivaikutteinen lokus löydettiin kytkentäryhmästä 7, missä merkki Omy7INRA alitti riskitason saaden $P < 0,001$ tilastollisen merkitsevyyden valoisuudelle ($F = 4,483$) ja värikylläisyydelle ($F = 3,581$).

Jokaiselle fileen värin muuttujista löydettiin vain kyseiseen ominaisuuteen vaikuttava QTL. Yhdestä kytkentäryhmästä löytyi QTL, johon kytketty merkki paljasti vain rocheen vaikuttavan QTL-alueen, sillä kytkentäryhmässä 17 mikrosatelliitti Omm1360 sai rochelle F -arvon $2,806$ ja alitti tutkimuskohtaisen riskitason P -arvolla $0,008$. Myös valoisuudelle löydettiin yksi kytkentäryhmä (27), jossa merkki Omm1364 paljasti vain valoisuuteen vaikuttavan QTL:n ($F = 3,239$, $P = 0,008$). Värikylläisyyteen vaikuttavia QTL:ia löydettiin kaksi, kytkentäryhmistä 8 ja 23. Kytkeäryhmässä 8 merkki Omm1009 ($F = 4,397$, $P < 0,001$) ja kytkentäryhmässä 23 merkki Ots522NWFSC ($F = 4,875$, $P < 0,001$) alittivat selvästi tutkimuskohtaisen riskitason.

Taulukko 11. Mikrosatelliitit ja niiden kytkentäryhmät, sekä varianssianalyysin F-arvot ja tilastolliset merkitsevyydet fileen väriä kuvaavissa muuttujissa.

	Kytkentäryhmä Nichols. ym.2003 mukaan	Roche		Lave		Cave	
		P-arvo	F-arvo	P-arvo	F-arvo	P-arvo	F-arvo
Ots517NWFSC	OA-I 1	<0,001 ***	4,158	<0,001 ***	3,406	0,004 **	2,626
Ogo1UW	OA-III 3	0,027 *	2,589				
One6ASC	OA-IV 4			0,031 *	2,164		
One107ADFG	OA-V 5	0,001 **	3,521	0,007 **	2,738		
Omy7INRA	OA-VII 7			<0,001 ***	4,483	<0,001 ***	3,581
Omm1009	OA-VIII 8					<0,001 ***	4,397
Ots513NWFSC	OA-X 10	0,047 *	2,185	0,075 *	1,956		
Omy1011UW	OA-XI 11	<0,001 ***	3,929	<0,001 ***	4,263	0,011 *	2,574
SSOSL32	OA-XI 11	<0,001 ***	3,779	<0,001 ***	4,278	0,005 **	2,672
OmyRGT3TUF	OA-XII 12	0,001 **	6,764	<0,001 ***	9,315	0,007 **	5,029
Omm1360	OA-XVII 17	0,008 **	2,806	0,031 *	2,251		
OmyRGT12TUF	OA-XVIII 18	0,002 **	3,958	<0,001 ***	4,615	0,004 **	3,518
Omy1191UW	OA-XIX 19			0,012 *	2,439		
Omy1090UW	OA-XXI 21			0,012 *	2,535		
Ots522NWFSC	OA-XXIII 23					<0,001 ***	4,875
Omm1364	OA-XXVII 27			0,008 **	3,239		
OmyRGT19TUF	OA-XXIX 29	0,025 *	2,352	0,032 *	2,246	0,038 *	2,175
OmyRGT34TUF	OA-XXX 30	<0,001 ***	4,153	<0,001 ***	4,307	0,007 **	2,605
Omy1006UW	OA-XXXI 31			0,010 *	3,095		

*** $p < 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p < 0,05$

3.5 Genotyyppien vaikutusten tarkastelu

Pleiotropia on yleistä suurivaikutteisilla geneeillä. Pleiotropiassa yksi geeni vaikuttaa useaan, toisistaan näennäisesti riippumattomaan ominaisuuteen ja aiheuttaa geneettistä korrelaatiota ominaisuuksien välillä (Falconer & Mackay, 1996). Pleiotropisten vaikutusten tutkiminen on vaikeaa, joten sen mahdolliset vaikutukset tutkittavien ominaisuuksien alleelien vaikutusten suuruuteen jätetään huomiotta. Tutkittavien ominaisuuksien alleelien vaikutuksia tarkasteltiin sekä perheittäin, että mikrosatelliiteittain laskemalla genotyyppien saamien arvojen poikkeamat ominaisuuksien keskiarvosta.

3.5.1 Koko-ominaisuudet

P-polven amerikkalaista kantaa olevat koiraat olivat ns. villikantaa, joiden oletettiin kantavan pienemmän koon alleleja. JALO-kantaa olevat P-polven naaraat olivat kohdanneet valintaa koko-ominaisuuksien suhteen, joten niiden oletettiin kantavan kokoa lisääviä alleleja. F1-polven vanhemmat olivat koko-ominaisuuksien puolesta enimmäkseen heterotsygootteja.

Pituuden alleelien tarkastelussa käytettiin esimerkkinä mikrosatelliittia OmyRGT19TUF (taulukot 12 ja 14). Alleelit 206 ja 231 näyttävät olevan peräisen P-polven amerikkalaiselta koiraalta ja liittyvän pieneen kokoon. Alleeli 231 vaikuttaa dominoivalta. Kaikkien perheiden emät kantavat kokoa kasvattavaa alleelia 214, jonka voidaan olettaa olevan vaikutukseltaan dominoiva. Alleeli 216 esiintyy sekä perheiden 834 ja 837 isillä, että kaikkien perheiden emillä. Se näyttäisi liittyvän isompaan kokoon, mutta olevan vaikutukseltaan resessiivinen. Perheiden 834 ja 837 isillä olevan alleelin 212 voidaan olettaa myös liittyvän suurikokoisuuteen.

Painoon vaikuttavia alleleja tarkasteltiin merkin OmyRGT8TUF genotyypeistä. Alleeli 128 löytyy kaikilta vanhemmilta ja se vaikuttaisi liittyvän pienikokoisuuteen eli pienempään painoon. Myös alleeli 163 liittyy pienikokoisuuteen ja vaikuttaa resessiiviseltä. Perheessä 834 näyttää olevan muita perheitä painavampia kaloja. Perheen 834 pienimmät yksilöt ovat 128/128 homotsygootteja. Suurikokoisuuden alleeli on 837 perheen emältä peritty alleeli 161, jonka voidaan olettaa olevan dominoiva. Suureen kokoon näyttää liittyvän myös alleeli 134.

Filepainoon vaikuttavia alleleja tarkasteltiin merkin Omy1006UW genotyypeistä. Pienikokoisuuden alleleja vaikuttaisivat olevan 207 sekä 215, joista alleeli 207 näyttää resessiiviseltä. Filepainoa lisäävänä alleelina esiintyi perheiden 834 ja 837 vanhemmillä oleva alleeli 235.

Taulukko 12. Pituuden, painon ja filepainon genotyyppien tarkastelu perheittäin kolmella eri mikrosatelliitilla, sekä genotyyppien saamien arvojen poikkeamat ominaisuuksien keskiarvosta.

Perhe	804		808		834		837	
	geno- tyyppi	poikk. ka	geno- tyyppi	poikk. ka	geno- tyyppi	poikk. ka	geno- tyyppi	poikk. ka
Pituus (mm)	206/214	-1,17	206/214	-3,09	212/214	55,24	212/214	8,10
OmyRGT19TUF	206/216	-3,65	206/216	-7,26	212/216	1,41	212/216	9,52
	214/231	-3,48	214/231	-0,87	214/216	23,99		
	216/231	-13,68	216/231	-8,88	216/216	-0,59		
	isä	206/231	206/231		212/216		212/216	
emä	214/216	214/216		214/216		214/216		
Paino(g)	128/128	-35,43	128/128	-137,34	128/128	62,05	128/128	-63,1
OmyRGT8TUF	128/163	-72,72	128/134	-73,57	128/134	70,90	128/134	4,90
	163/163	-99,93	128/163	-88,10	128/163	152,15	128/161	75,48
	isä	128/163	128/163		128/134		128/134	
emä	128/163	128/134		128/163		128/161		
Filepaino(g)	207/207	-71,58	207/207	-64,17	207/207	36,63	207/215	30,79
Omy1006UW	207/215	-11,26	207/215	-52,11	207/235	94,35	215/235	65,00
	215/215	-60,06			235/235	53,73	235/235	74,53
	isä	207/215	207/215		207/235		207/235	
emä	207/215	207/207		207/235		215/235		

3.5.1 Fileen väriin liittyvät ominaisuudet

Fileen väriin liittyvissä ominaisuuksissa alleelien väliset erot eivät olleet yhtä selkeitä, kuin koko-ominaisuuksissa. Poikkeamat keskiarvosta olivat pieniä johtuen ominaisuuksien mitta-asteikosta. Rochen alleelien tarkastelussa käytetyssä merkissä muuntelu oli pientä, kun taas valoisuuden ja värikylläisyyden tarkastelussa käytetyissä merkeissä muuntelua oli enemmän kuin koko-ominaisuuksissa, joka myös vaikeutti alleelien vaikutusten arviointia.

Rochen alleelien tarkastelussa käytettiin esimerkkinä mikrosatelliittia OmyRGT3TUF (taulukot 13 ja 14). Jokaisen perheen isät olivat genotyyppiä 133/133. Perheissä 804 ja 837 myös emät olivat samaa genotyyppiä, joten perheiden kaikki yksilöt olivat homotsygootteja 133/133. Perheissä 808 ja 834 esiintyi myös heterotsygootteja, sillä niiden emät kantoivat kumpikin eri alleelia. Voidaan olettaa, että alleeli 133 lisää roche-arvoa, kun taas alleelit 139 ja 129 vähentävät sitä. Alleelin 139 vaikutus vaikuttaisi suuremmalta kuin alleelin 129, mutta koska erot alleelien välillä ovat hyvin pieniä, kovin varmoja johtopäätöksiä kunkin alleelin vaikutuksesta rocheen merkillä OmyRGT3TUF ei voida tehdä.

Taulukko 13. Rochen, valoisuuden (lave) ja värikylläisyyden (cave) genotyyppien tarkastelu perheittäin kolmella eri mikrosatelliitilla, sekä genotyyppien saamien arvojen poikkeamat ominaisuuksien keskiarvosta.

Perhe	804		808		834		837	
	geno- tyyppi	poikk. ka	geno- tyyppi	poikk. ka	geno- tyyppi	poikk. ka	geno- tyyppi	poikk. ka
Roche	133/133	0,67	133/133	-1,20	129/133	0,11	133/133	0,42
Omy								
RGT3TUF			133/139	-1,19	133/133	0,42		
isä	133/133		133/133		133/133		133/133	
emä	133/133		133/139		133/129		133/133	
Lave	142/155	-1,46	155/155	1,42	142/155	0,34	142/155	0,20
Omy								
RGT34TUF	148/155	-1,45	155/165	1,25	149/155	-1,05	149/155	-0,87
	142/165	-0,49	155/178	1,94	142/178	-0,89	142/178	-1,35
	148/165	-1,62	165/178	2,22	149/178	0,42	149/178	-1,73
isä	155/165		155/165		142/149		142/149	
emä	142/148		155/178		155/178		155/178	
Cave	177/187	1,47	171/177	-0,11	177/187	1,18	177/187	0,87
Ots	181/187	0,16	171/181	-1,45	187/187	0,93	177/192	-1,52
517NWFSC	177/200	0,44	177/189	-2,03	177/200	0,40	187/187	0,90
	181/200	0,84	181/189	-1,88	187/200	0,20	187/192	0,52
isä	177/181		177/181		177/187		177/187	
emä	187/200		171/189		187/200		187/192	

Valoisuuteen vaikuttavia alleeleja tarkasteltiin merkin OmyRGT34TUF genotyypeistä. Pienemmät valoisuuden arvot kuvaavat tummempaa eli halutumman väristä lihaa, johon vaikuttaisi liittyvän alleelit 142, 148 ja 149. Fileen valoisuutta lisääviksi alleeleiksi voidaan olettaa alleelit 155, 165 ja 178. Perheiden 808, 834 ja 837 emät ovat genotyyppejä 155/178 ja perheen 808 isä genotyyppejä 155/165. Perheessä 808 valoisuus saa enemmän keskiarvosta poikkeavia positiivisia arvoja eli F2-polven jälkeläiset saavat suurempia valoisuuden arvoja kuin muiden perheiden yksilöt.

Värikylläisyyteen vaikuttavia alleeleja tarkasteltiin merkin Ots517NWFSC genotyypeistä. Kaikkien perheiden isillä olevan 177 alleelin voidaan olettaa olevan värin täyteläisyyttä vähentävä, kuten myös alleelit 181 ja 189. Täyteläisempään eli halutumpaan väriin liittynevät perheiden 804 ja 834 emiltä saadut alleelit 187 ja 200. Alleeli 187 vaikuttaa resessiiviseltä.

Taulukko 14. Tutkittavien ominaisuuksien genotyyppien tarkastelu aiemmin mainituilla kuudella mikrosatelliitilla, genotyyppien saamat keskiarvot ja niiden poikkeamat tutkittavien ominaisuuksien keskiarvoista.

	Genotyyppi	ka	poikkeama ka:sta
Pituus (cm)	216/231	416,94	-11,06
OmyRGT19TUF	206/216	422,64	-5,36
	214/231	425,68	-2,32

	206/214	425,89	-2,11
	216/216	427,5	-0,5
	212/216	435,15	7,15
	212/214	440	12
	214/216	452,08	24,08
Paino (g)	163/163	924,17	-99,83
OmyRGT8TUF	128/163	955,45	-68,55
	128/128	996,53	-27,47
	128/134	1010,11	-13,89
	128/161	1099,58	75,58
	134/163	1112,12	88,12
	134/161	1210,71	186,71
Filepaino (g)			
Omy1006UW	215/215	556,52	-60,48
	207/207	577,64	-39,36
	207/215	586,22	-30,78
	215/235	643,16	26,16
	235/235	677,8	60,8
	207/235	690,27	73,27
Roche	133/139	26,6	-1,2
OmyRGT3TUF_3	129/133	27,9	0,1
	133/133	27,95	0,15
Lave	148/165	34,49	-1,61
OmyRGT34TUF_3	148/155	34,66	-1,44
	142/178	34,96	-1,14
	149/155	35,14	-0,96
	142/165	35,62	-0,48
	149/178	35,69	-0,41
	142/155	35,88	-0,22
	155/165	37,36	1,26
	155/155	37,53	1,43
	155/178	38,11	2,01
	165/178	38,3	2,2
Cave	177/189	14,46	-2,04
Ots517NWFSC_3	181/189	14,61	-1,89
	177/192	14,97	-1,53
	171/181	15,04	-1,46
	171/177	16,38	-0,12
	181/187	16,65	0,15
	187/200	16,69	0,19
	177/200	16,91	0,41
	187/192	17,01	0,51
	187/187	17,4	0,9
	181/200	17,33	0,83
	177/187	17,7	1,2

4. Yhteenveto ja johtopäätökset

Tämän työn tavoitteena oli selvittää löytyykö kirjolohelta QTL:ia fileen väri ja kalan koko-ominaisuuksille. Useita suurivaikutteisia lokuksia, jotka alittivat tutkimuskohtaisesti valitun riskitason, löydettiin jokaisessa tutkittavassa ominaisuudessa. Tutkimuksessa saadut arviot QTL:ien lukumäärästä ovat aliarvioita todellisesta tutkittavaan ominaisuuteen vaikuttavien lokusten määrästä, sillä läheisesti kytkeytyneet lokukset on vaikea erottaa toisistaan ja osa hyvin pienivaikutteisista QTL:sta jää huomiotta. Yhden merkin analyysissä voidaan olettaa yhtä QTL:ta tutkitussa kromosomissa. Tutkimuksessa saadut tulokset kertovat QTL:n sijainnin kytkentäryhmittäin ja antavat pohjan kirjolohen koko-ominaisuuksiin ja fileen väriin liittyvien QTL:ien sijainnin tarkentamiselle. QTL-analyysin tehoa alensi jonkin verran se, että jokaiseen kytkentäryhmään ei saatu genotyyppitettyä merkkiä, jolloin kuusi kytkentäryhmää jäi analysoimatta. Mikrosatelliittien lukumäärää kasvattamalla jokaisessa kytkentäryhmässä saataisiin täydellisemmin selvyyttä tutkittaviin ominaisuuksiin vaikuttavien QTL:ien sijainnista. Lisäämällä mikrosatelliittien määrää kytkentäryhmissä, voitaisiin tutkimuksessa löydettyjen QTL:ien sijaintia ja lukumäärää tarkentaa. Jotta tuloksia voitaisiin hyödyntää jalostusvalinnassa, on hienokartoitus QTL-alueiden rajaamiseksi tarpeen.

Kalan kokoon vaikuttavia QTL-alueita, jotka vaikuttivat sekä pituuteen, painoon että filepainoon, löydettiin yhdeksästä eri kytkentäryhmästä (1, 7, 8, 11, 15, 17, 24, 29 ja 31). Pituuteen liittyvä QTL vaikutti jokaisessa kytkentäryhmässä samanaikaisesti sekä painoon, että filepainoon. Painoon ja filepainoon liittyviä QTL-alueita löytyi kymmenestä kytkentäryhmästä (5, 6, 10, 17, 18, 19, 21, 22, 27 ja 30). Filepaino oli kalan koko-ominaisuuksista ainoa, jolle löytyi pelkästään kyseiseen ominaisuuteen vaikuttavat QTL:t kytkentäryhmistä 3 ja 4.

Jos kirjolohen koko-ominaisuuksia halutaan parantaa merkkiavusteisella valinnalla, on se tämän tutkimuksen tulosten perusteella mahdollista. Koska pituuden, painon ja filepainon välillä on vahva geneettinen yhteys, ei kaikkia kolmea ominaisuutta tarvitse ottaa mukaan jalostusohjelmaan. Keskittymällä kaikkiin kolmeen koko-ominaisuuteen vaikuttaviin QTL-alueisiin, pystytään merkkiavusteisella valinnalla jalostamaan sekä pituutta, painoa että filepainoa. Lohikaloilla kalan suuri koko on yhteydessä korkeaan rasvapitoisuuteen. Valittaessa kalan kokoon vaikuttavia QTL-alueita pyrkimyksenä kasvattaa kalan kokoa, tulee rasvapitoisuutta kontrolloida ravinnon matalalla rasvapitoisuudella ja korkealla proteiinipitoisuudella.

Fileen väriin vaikuttavia QTL-alueita löytyi useita. Viidestä kytkentäryhmästä (1, 11, 12, 18 ja 30) löydettiin QTL, joka vaikutti sekä rocheen, valoisuuteen että värikylläisyyteen. Rocheen ja valoisuuteen vaikuttavia QTL-alueita löydettiin kahdesta kytkentäryhmästä (5, 11) ja fileen valoisuuteen ja värikylläisyyteen vaikuttava suurivaikutteinen lokus löydettiin kytkentäryhmästä 7. Jokaiselle tutkituista fileen värin muuttujista löydettiin vain kyseiseen ominaisuuteen vaikuttava QTL. Fileen väriin liittyviä kaikkia kolmea ominaisuutta pystyttäisiin siten mahdollisesti jalostamaan merkkiavusteisella valinnalla.

Jokaista tutkittavaa ominaisuutta ja sen alleelien vaikutuksia tarkasteltiin genotyyppien avulla yhdessä kytkentäryhmässä, johon liittyvän merkin avulla oli kytkentäryhmästä löydetty QTL. Koko-ominaisuuksissa alleelien vaikutukset tulivat helpommin esille kuin fileen väriin liittyvissä ominaisuuksissa, joissa poikkeamat keskiarvosta olivat pieniä johtuen ominaisuuksien mitta-asteikosta. Alleelien vaikutusten suuruuden arviointi paljasti, että F2-polven yksilöiden genotyyppillä oli vaikutusta niiden saamiin tuloksiin ja että tutkittavien

ominaisuuksien genotyypeistä oli löydettävissä tutkittavaa ominaisuutta lisääviä ja vähentäviä alleleja. Ominaisuuteen positiivisesti vaikuttavia alleleja sisältäviä genotyyppejä valikoimalla voitaisiin helposti parantaa valinnan tehoa. Lokukseen kohdistuva valinta tehoaa kuitenkin vain lyhyen aikaa, sillä haluttujen alleelien yleistyessä täytyy etsiä uusia ominaisuuteen vaikuttavia QTL:ia.

Valintajalostuksen tulokset näkyvät ensi kerran vasta noin neljän vuoden päästä emokalojen valinnasta. Nykyisessä jalostusohjelmassa kaikki kalat mitataan kolme kertaa elämänsä aikana. Ensimmäisessä mittauksessa poikasvaiheessa yksilöt merkitään, joten niistä voitaisiin ottaa DNA-näytteet samalla kertaa. Analyyseihin tarvittavan DNA:n määrä on erittäin pieni, sillä näytteeksi riittää pieni eväpala, verinäyte tai suomu eli näytteet voidaan ottaa eläviltä kaloilta. Merkkiavusteisella valinnalla emokalat voitaisiin valita jo ensimmäisen mittauksen yhteydessä ensimmäisen kasvukauden jälkeen.

Suuri osa kotimaisesta kirjolohesta menee jatkojalostukseen, joten lihan laatu on kaupallisten yritysten tärkeimpiä kriteerejä. Merkkiavusteista valintaa voidaan käyttää myös muissa populaatioissa kuin jalostusohjelmassa, jos JALO-kannan kaloja jaetaan kaupallisille kalanviljelylaitoksille. Merkkiavusteisen valinnan avulla voidaan valita yritysten emokalastoja ja parantaa fileen väriä ja kalan kokoon liittyviä ominaisuuksia ilman kalojen mittaamista.

Kasvun mittaaminen on nykyisin helppoa ja siihen perustuva jalostusarvostelu paljastaa yksilöiden jalostuspotentiaalin melko luotettavasti. Tutkittavista ominaisuuksista merkkiavusteisen valinnan tulisi kohdistua lähinnä filepainoon ja fileen väriin liittyviin ominaisuuksiin, joita ei pystytä mittaamaan kandidaateista, vaan se on tehtävä teurastushetkellä. Näille kaikille löydettiin vain kyseiseen ominaisuuteen vaikuttava QTL, joten se olisi tämän tutkimuksen tulosten perusteella mahdollista. Kaikkien yksilöiden genotyypitys tulisi varmasti liian kalliiksi, joten voitaisiin ajatella genotyypityksen ja valinnan kohdistamista emokaloihin. Mikrosatelliittianalytiikan hyödyn arvioimiseksi tarvittaisiin tutkimusta eri ominaisuuksien jalostuksessa saavutettavissa olevasta taloudellisesta hyödystä verrattuna nykyiseen kirjolohen jalostusohjelmaan.

Kiitokset

Kiitokset kalojen kasvatuksesta, mittausten tekemisestä ja F2-mallin risteytyksistä, jotka mahdollistivat tämän tutkimuksen eläinaineiston, kuuluvat RKTL:n Tervon laitoksen Tuija Paanaselle, Ossi Ritolalle ja koko laitoksen henkilökunnalle. Kiitokset myös Susanna Airaksiselle ja Kari Ruohoselle RKTL:lta laatuominaisuuksien mittausten järjestämisestä.

Suuret kiitokset Otso Järvisalolle RKTL:n Tervon laitokselta QTL risteytysten aloittamisesta.

Kiitokset MTT:n Antti Kauselle tutkimuksen suunnittelusta, kirjolohen valintajalostuksen kehittämisestä ja tekstini kommentoimisesta.

Kiitokset myös MTT:n Harri Vehviläiselle pro gradu -työni lukemisesta ja kommentoimisesta.

Rahallisesta tuesta haluan välittää kiitokseni MTT:n Strategisille tutkimusrahastoille.

Kari Elolle suuret kiitokset pro gradu -työni ohjauksesta, avusta tekstin muokkaamisessa ja kaikista neuvoista ja ideoista.

Kirjallisuus

- Aho, T., Piironen, J. & Pursiainen, M. 2002. Avain viljeltävien taimen-, harjus- ja siikaemokalastojen geneettiseen tietokantaan Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen vesiviljelyssä. *Kala- ja riistaraportteja* 253.
- Allendorf, F. & Thorgaard, G. 1984. Tetraploidy and the evolution of Salmonid fishes. *New York: Plenum Publishing*.
- Araneda, C., Neira, R. & Iturra, P. 2005. Identification of a dominant SCAR marker associated with colour traits in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 247:67-73.
- Falconer, D. & Mackay, T. 1996. Introduction to quantitative genetics. Essex: Longman Group Ltd.
- Fleming, I. & Gross, M. 1994. Breeding competition in a Pacific salmon (Coho: *Oncorhynchus kisutch*). Measures of natural and sexual selection. *Evolution* 48: 637-657.
- Gjerde, B. 1986. Growth and reproduction in fish and shellfish. *Aquaculture* 57:37–55.
- Gjerde, B. 1989. Body traits in rainbow trout: I. Phenotypic means and standard deviations and sex effects. *Aquaculture* 80:7–24.
- Gjerde, B. & Gjedrem, T. 1984. Estimates of phenotypic and genetics parameters for carcass traits in Atlantic Salmon and rainbow trout. *Aquaculture* 80:25-44.
- Gjerde, B. & Schaeffer, L. 1989. Body traits in rainbow trout. II. Estimates of heritabilities and of phenotypic and genetic correlations. *Aquaculture* 36:97-110.
- Gross, M. 1985. Disruptive selection for alternative life histories in salmon. *Nature* 313: 47-48.
- Guyomard, R., Mauger, S., Tabet-Canale, K., Martineau, S., Genet, C., Krieg, F. & Quillet, E. 2006. A Type I and Type II microsatellite linkage map of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with presumptive coverage of all chromosome arms. *BMC Genomics* 7:302.
- Kause, A., Ritola, O., Paananen, T., Mäntysaari, E. & Eskelinen, U. 2002. Coupling body weight and it's composition: a quantitative genetic analysis in rainbow trout. *Aquaculture* 211:65-79.
- Kause, A., Ritola O. & Paananen, T. 2003. Ulkomuoto-ominaisuudet kirjoloihen valintajalostuksessa. *Suomen Kalankasvattaja* 3: 34-35.

- Kause, A., Paananen, T., Ritola, O. & Koskinen, H. 2007a. Direct and indirect selection of visceral lipid weight, fillet weight, and fillet percentage in a rainbow trout breeding program. *Journal of Animal Science* 85:3218-3227.
- Kause, A., Tobin, D., Mäntysaari, E., Martin, S., Houlihan, D., Kiessling, A., Rungruangsak-Torrissen, K., Ritola, O. & Ruohonen, K. 2007b. Genetic potential for simultaneous selection of growth and body composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) depends on the dietary protein and lipid content: Phenotypic and genetic correlations on two diets. *Aquaculture* 271:162–172.
- Kause, A., Stien, L., Rungruangsak-Torrissen, K., Ritola, O., Ruohonen, K. ja Kiessling, A. 2008. Image analysis as a tool to facilitate selective breeding of quality traits in rainbow trout. *Livestock Science* 114:315-324.
- Kause, A. 2009. Aquaculture breeding programmes at the genomic era. *Fishfarming Xpert* 1: 54-56.
- Khoo, S., Ozaki, A., Sakamoto, T. & Okamoto, N. 2000. Four highly polymorphic dinucleotide microsatellites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Genetics* 31:73-74.
- Kuukka, H., Peuhkuri, N. & Kolari, I. 2006. Viljeltyjen lohikalojen kaihi -kartoitus vuonna 2004. *Kala- ja riistaraportteja nro 377*.
- Kuukka-Anttila, H., Peuhkuri, N., Kolari, I., Paananen, T. & Kause, A. 2010. Quantitative genetic architecture of parasite-induced cataract in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Heredity* 104:20-27.
- Leder, E., Danzmann, R. & Ferguson, M. 2006. The candidate gene, clock, localizes to a strong spawning time quantitative trait locus region in rainbow trout. *Journal of Heredity* 97:74–80.
- Mackay, T. 2001. The genetic architecture of quantitative traits. *Annual Review of Genetics* 35:303-339.
- Marty-Mahé, P., Loisel, P., Fauconneau, B., Haffray, P., Brossard, D. & Davenel, A. 2004. Quality traits of brown trout (*Salmo trutta*) cutlets described by automated color image analysis. *Aquaculture* 232:225-240.
- Martyniuk, C., Perry, G., Mogahadam, H., Ferguson, M. & Danzmann, R. 2003. The genetic architecture of correlations among growth-related traits and male age at maturation in rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 63:746-764.
- Naish K. & Park L. 2002. Linkage relationships for 35 new microsatellite loci in chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Animal Genetics* 33:312–27.
- Nam, Y., Park, J., Kim, K. & Kim, D. 2003. A rapid and simple PCR-based method for analysis of transgenic fish using a restricted amount of fin tissue. *Transgenic Research* 12: 523–525.

- Nichols, K., Young, W., Danzmann, R., Robison, B., Rexroad, C., Noakes, M., Phillips, R., Bentzen, P., Spies, I., Knudsen, K., Allendorf, F., Cunningham, B., Brunelli, J., Zhang, H., Ristow, S., Drew, R., Brown, K., Wheeler, P. & Thorgaard, G. 2003. A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Genetics* 34: 102-115.
- Oetting, W., Lee, H., Flanders, D., Wiesner, G., Sellers, T. & King, R. 1995. Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics* 30:450-458.
- Olsen, J., Bentzen, P. & Seeb, J. 1998. Characterization of seven microsatellite loci derived from pink salmon. *Molecular Ecology* 7:1087-1089.
- O'Malley, K., Sakamoto T., Danzmann R. & Fergusib, M. 2002. Quantitative trait loci for spawning date and body weight in rainbow trout: testing for conserved effects across ancestrally duplicated chromosomes. *Journal of Heredity* 94: 273-284.
- Orenius, H. 2004. Valintajalostuksella hyviin tuloksiin. *Suomen Kalankasvattaja* 5:28-30.
- Palti, Y., Danzmann, R. & Rexroad, C. 2003. Characterization and mapping of 19 polymorphic microsatellite markers for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Genetics* 34:153-156.
- Perez-Enciso, E., Garcia-Bernal, P. & Perez-Enciso, M. 2005. Atlas: A java-based tool for managing genotypes. *Journal of Heredity* 96: 623-625.
- Ranta, E., Rita, H. & Kouki, J. 2005. Biometria –tilastotiedettä ekologeille. Yliopistopaino Helsinki.
- Reid, D., Szanto, A., Glebe, B., Danzmann, R. & Ferguson, M. 2005. QTL for body weight and condition factor in Atlantic salmon (*Salmo salar*): comparative analysis with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Heredity* 94:166-172.
- Rexroad, C., Coleman, R., Gustafson, A., Hershberger, W. & Killefer, J. 2002. Development of rainbow trout microsatellite markers from repeat enriched libraries. *Marine Biotechnology* 3:12-16.
- Rexroad, C., Palti, Y., Gahr, S. & Vallejo, R. 2008. A second generation genetic map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genetics* 9:74.
- Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos 2008. Kalatalous tilastoina 2008. Vantaa, 26 s.
- Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos 2009. Tilastoja 4 Vesiviljely 2008. Tampere, 27 s.
- Roff, D. 1997. Evolutionary quantitative genetics. Toronto: Chapman and Hall, International Thompson Publishing, 493 s.
- Sakamoto, T., Danzmann, R., Okamoto, N., Ferguson, M. & Ihssen, E. 1999. Linkage analysis of quantitative trait loci associated with spawning time in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 173: 33-43.

Sakamoto, T., Danzmann, R., Gharbi, K., Howard, P., Ozaki, A., Khoo, S., Woram, R., Okamoto, N., Ferguson, M., Holm, L-E., Guyomard, R. & Hoyheim, B. 2000. A Microsatellite Linkage Map of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Characterized by Large Sex-Specific Differences in Recombination Rates. *Genetics* 155:1331-1345.

Scribner, K., Gust, J. & Fields, R. 1996. Isolation and characterization of novel salmon microsatellite loci: cross-species amplification and population genetic applications. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53: 833-41.

Sidak, Z. 1967. Rectangular confidence regions for the means of multivariate normal distributions. *Journal of American Statistical Association* 62: 626-633.

Siitonen, L. & Rissanen, I. 1992. Kirjoloihen valintaohjelma käynnistynyt. *Suomen Kalankasvattaja* 5:47.

Siitonen, L. & Rissanen, I. 1993. Kasvuominaisuuksien muuntelusta kirjolohella. *Suomen Kalankasvattaja* 2:24-26.

Slettan, A., Olsaker, I. & Øystein, L. 1997. Segregation studies and linkage analysis of Atlantic salmon microsatellites using haploid genetics. *Heredity* 78:620-627.

Spies, I., Brasier, D., O'Reilly, P., Seamons, T. & Bentzen, P. 2005. Development and characterization of novel tetra-, tri-, and dinucleotide microsatellite markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Ecology Notes* 5(2):278-281.

Suomen Kalankasvattajaliitto ry. URL=<http://www.kalankasvatus.fi>. Viitattu 02.12.2009.

Thorgaard, G. 1983. Chromosomal differences among rainbow trout populations. *Copeia* 3:650-662.

Tobin, D., Kause, A., Mäntysaari, E., Martin, S., Houlihan, D., Dobby, A., Kiessling, A., Rungruangsak-Torrissen, K., Ritola, O. & Ruohonen, K. 2006. Fat or lean? The quantitative genetic basis for selection strategies of muscle and body composition traits in breeding schemes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 261:510-521.

Wenne, R., Boudry, P., Hemmer-Hansen, J., Lubieniecki, K., Was, A. & Kause, A. 2007. What role for genomics in fisheries management and aquaculture? *Aquatic Living Resources* 20: 241-255.

Williams, J. 2005. The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology. *Revue Scientifique et Technique - Office International des Épidémiologistes* 24: 379-391.