

Keskkonnateabe Keskus

Geneetiliste meetodite kasutamine Eesti hundipopulatsiooni demograafilistes uuringutes

Eesti ja Läti hundipopulatsiooni analüüs

Aruanne

Töö teostaja: MTÜ Naturalia

Reg. kood 80155975

Vanemuise 46, 51014 Tartu

Leping 3-3/48 (14.09.2011)

Tartus, 24.10.2012

Uuring on finantseeritud SA Keskkonnainvesteeringute Keskuse poolt

Sissejuhatus

Hunt on tippkiskjana oluline nii oma saakloomade arvukuse ühe reguleerijana kui ka marutaudi, kärntõve ja mitmete nii inimestele kui mets- ja koduloomadele eluohtlike parasiitide levitajana (sealhulgas ehinokokk-paelussid, *Echinococcus sp.*). Et mõista hundipopulatsioonis toimuvaid protsesse, on äärmiselt oluline teada, kuidas on hundipopulatsioonid struktureeritud ning millised on olulisemad liikumissuunad ja -barjäärid.

Töö eesmärk

Hundipopulatsiooni geneetiline seire, mille abil on võimalik kindlaks teha populatsiooni geneetiline struktuur, mitmekesisus, seotus naaberriikide populatsioonidega ja sisseränne teistest riikidest.

Materjal ja meetodid

Geneetilise analüüsi teostasime 120. hundi koeproovide alusel. Analüüsisime kokku 20 mikrosatelliitlookust: H200, H10, H17, H54, H79, H208, H209, H213, H250, H253, H466, H642, H130, VWF ning CPH2, CPH4, CPH8, C09.173, CPH12 ja CXX22. DNA eraldamine koeproovidest viidi läbi, kasutades Roche'i High Pure PCR Template preparation Kit'i. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) segu koosnes järgnevatest komponentidest: 0,25 u Taq polümeraasi (Amplitaq Gold), 1 µL 10 X PCR puhver, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 3,3 pmol praimereid ning 20 ng DNA-d iga reaktsiooni kohta.

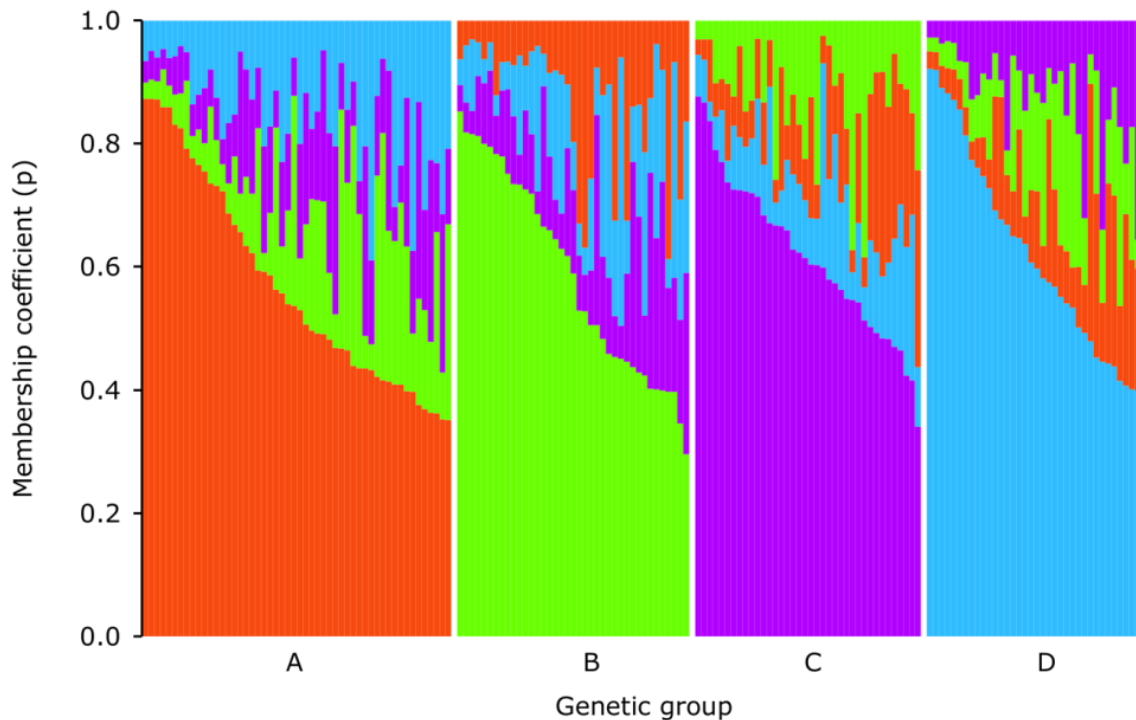
PCR'i reaktsioonitingimused olid järgnevad: 10 minutit 95° denaturatsiooni, 11 tsüklit 30 s 94 °C, 30 s 58° C, 60 s 72 °C (ühtlaselt alaneva seondumistemperatuuriga (– 0,5 ° C tsükli kohta) ning 28 tsüklit 30 s 94 °C, 30 s 52 °C, 60 s 72 °C. Lõplik elongatsioon 10 minutit 72 °C. Pärast PCR'i segu lahjendati veega (5x lahjendus) ning segati lookused kolme kapillaari (lookused H200, H10, H17, H54, H79, H208, H209, lookused H213, H250, H253, H466, H642, H130, VWF ning lookused CPH2, CPH4, CPH8, C09.173, CPH12 ja CXX22). Kapillaari segati ka lookuste pikkuse identifitseerimiseks 0,25 µL The GeneScan™ 500 LIZ'i.

PCR produktid analüüsiti ABI PRISM 3100 kapillaarsekvenaatoril. Alleelipikkused identifitseeriti programmiga Genemapper v4.0.

Lõplikesse analüüsidesse kaasati ka varem genotüpeeritud isendeid nii Eestist kui Lätist. Mikrosatelliitide statistiline analüüs viidi läbi programmiga GenAlEx 6.3 (Peakall ja Smouse 2006), et arvutada, kui mitu alleeli oli iga lookuse kohta valimis esindatud ja kui suur on populatsiooni geneetiline mitmekesisus. Programmiga Structure 2.3.2 (Pritchard jt. 2000) arvutati Bayesi statistikal põhinevalt võimalike alampopulatsioonide olemasolu ehk hundipopulatsiooni geneetilist differentseerumist. Iteratiivset interpolatsioonimeetodit koos bootstrappimisega (Hindrikson jt., käsikiri) kasutati geneetiliselt eritunud suuremate hundigruppide tuumikala kindlakstegemiseks. Programmi Bayesass 1.3 (Wilson ja Rannala 2003) abil tuvastati migratsioonisuunad eri geneetiliselt eristuvate gruppide vahel ning migratsiooni tugevus. Ruumistatistilist meetodit DresD (Keis jt. 2012) kasutati huntide migratsioonikoridoride ja liikumisbarjääride tuvastamiseks.

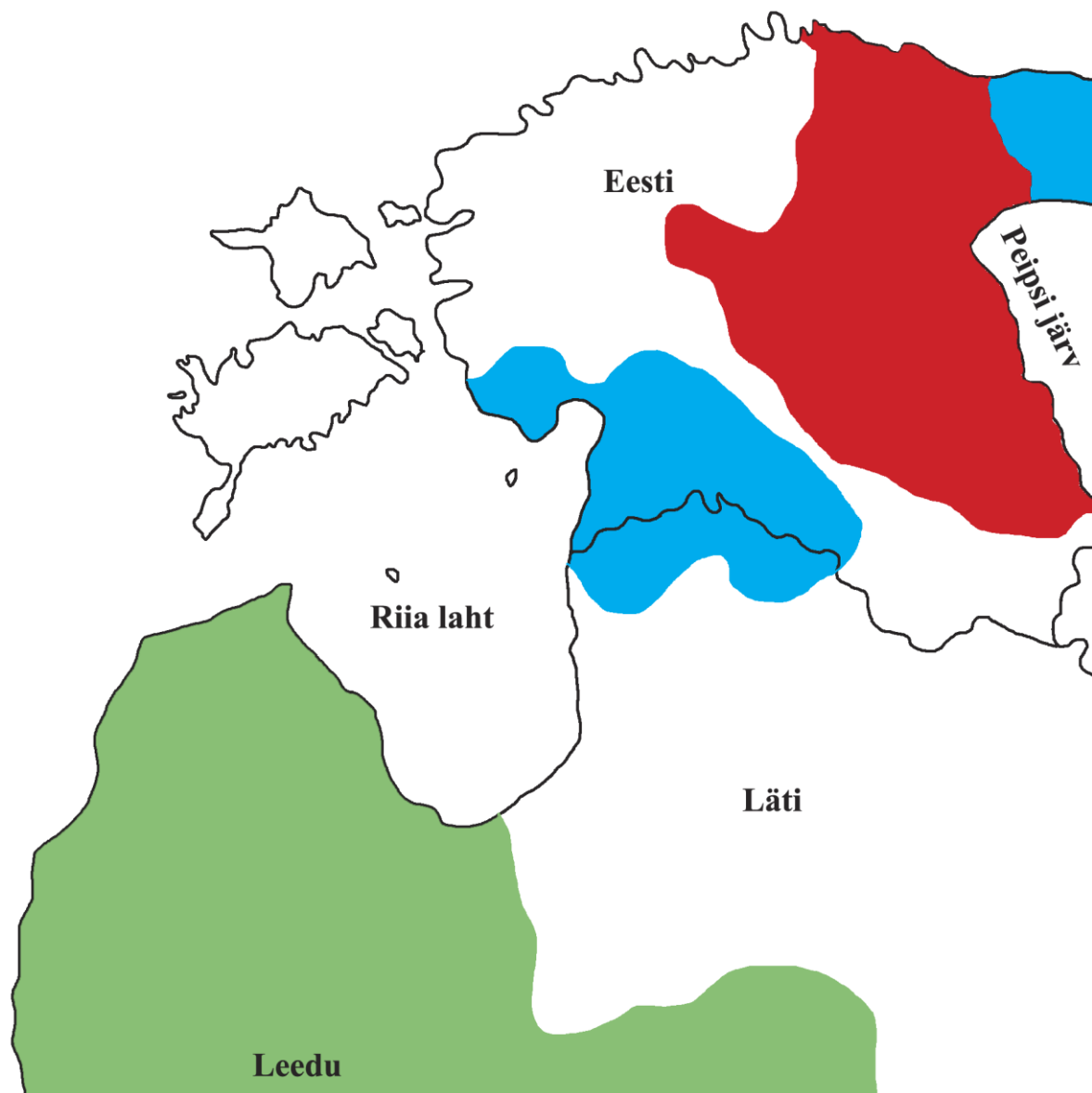
Tulemused ja arutelu

Eesti ja Läti hundiproovidel analüüsiti 20 mikrosatelliitlookuse variatsiooni, milledest lõpliku analüüsi jaoks sobis 16: FH2001, FH2010, FH2017, FH2054, FH2079, FH2088, FH2096, vWF, AHT130, M-CPH2, M-CPH4, M-CPH12, C09.173, C466, C20.253, CXX22 (4 lookust olid olulisel määral Hardy-Weinbergi tasakaalust väljas ja/või sisaldasid null-allele, mistõttu jäeti edasisest analüüsist välja). Tulemusena saadi iga hundi jaoks alleelsageduste muster, nn. geneetiline pass, mis lubas edasi analüüsida heterosügootsust ehk geneetilist mitmekesisust, samuti populatsiooni geneetilist struktuuri ja populatsioonis toimuvaid protsesse. Heterosügootsuse määraks saadi 0.75, mis näitab, et geneetiline mitmekesisus hundipopulatsioonis on kõrge. Keskmise alleelide arv lookuse kohta oli 8, mis on samuti kõrge, ning inbriidingu koefitsient oli kergelt negatiivne (-0.04), mis viitab, et inbriiding pole probleemiks. Klasteranalüüs programmiga Structure näitas, et Eesti-Läti hundipopulatsioon jaotub neljaks üksteisest geneetiliselt eristunud grupiks A-D (Joonis 1), mis näitab, et terve hulk isendeid kuulub kindlasse gruppi suure tõenäosusega (üle 0.7), samas kui osad isendid on nõ. piiri peal, st. kuuluvad määratud gruppi väiksema tõenäosusega (0.5-0.7).



Joonis 1. Eesti-Läti hundipopulatsiooni jaotumine neljaks geneetiliselt eristuvaks grupiks (A-D) vastavalt analüüsile programmiga Structure.

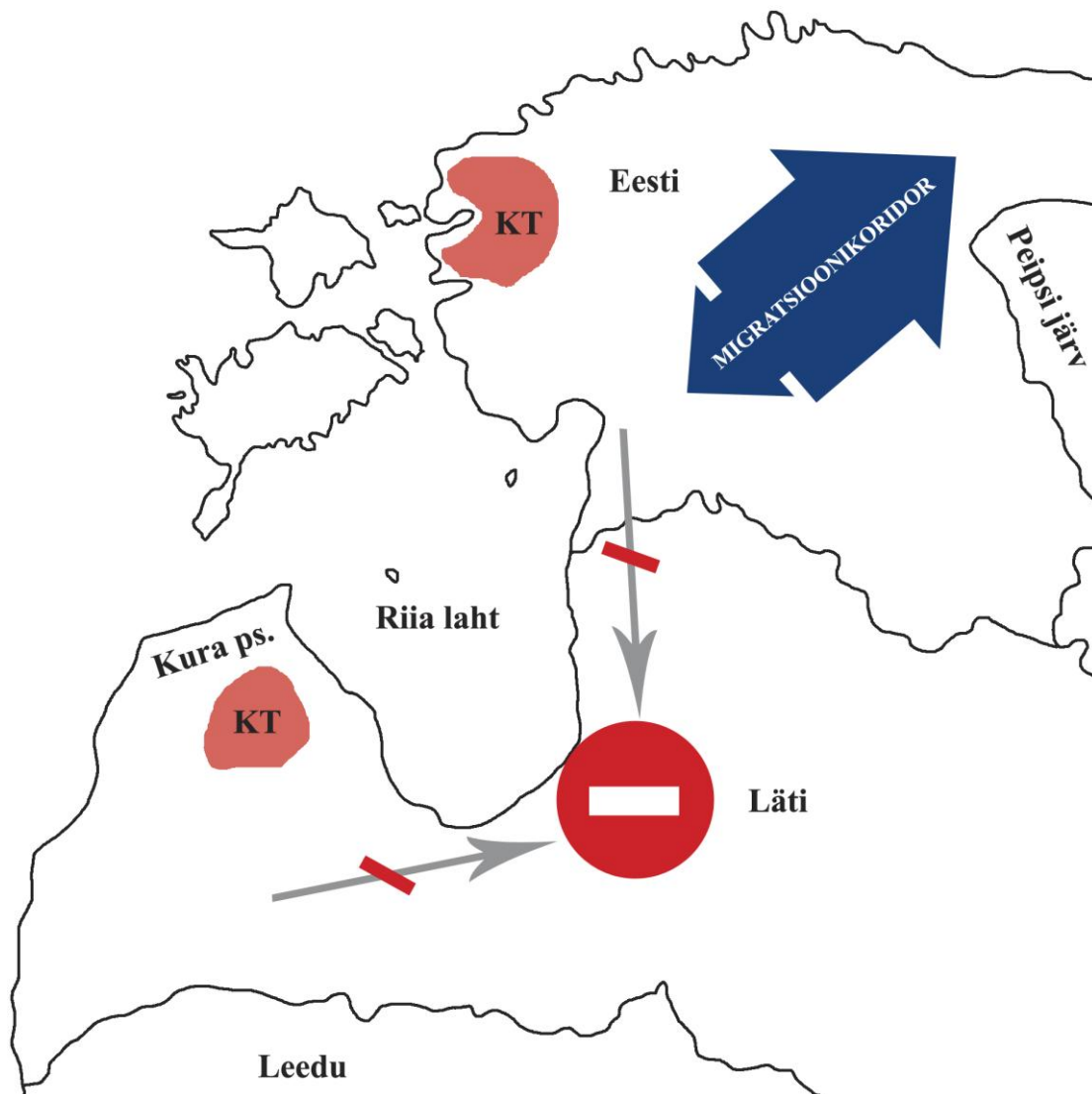
Struktureerumist neljaks grupiks toetas ka interpolatsioonianalüüs, mis tuvastas, et nelja grupi tuumikalad üksteisega ei kattunud (Joonis 2) – jooniselt on näha, et üks tuumikaladest on selgelt Läti spetsiifiline (grupp B, roheline), samas kui kahe grupi tuumikalad (grupid A ja D) on jällegi Eesti spetsiifilised (sinine ja oranž). Grupp C on aga selge tuumikalata, ulatudes üle terve hundi levila Eestis ja Lätis. Kuidas on selline struktuur tekkinud? Pakume välja, et enne hundipopulatsiooni viimast demograafilist madalseisu 1960-ndate keskel ei olnud populatsioon struktureeritud, vaid koosnes praeguse üle mõlema riigi levinud grupi C (lilla) eellastest. Kõrge jahisurve, mis viis populatsiooni madalseisu, lõhkus aga selle grupi fragmentideks, mille tulemusena jäi suur osa seni huntide poolt asustatud territooriume vakantseiks ning need asustati aja jooksul lõuna poolt tulnud huntidega (praegune Läti-spetsiifiline grupp B joonisel 2) ning idast tulnud huntidega (praegused grupid A ja D). Tasapisi laiendas end ka algne fragmentideks lõhutud grupp (praegu grupp C).



Joonis 2. Interpolatsioonimeetodil tuvastatud kolme geneetilise grupi (A – punane; B – roheline; D - sinine) tuumikalad. Grupp C (joonisel 1 lilla) on tuumikalata ja ulatub üle Eesti-Läti huntide asuala

Ruumistatistiline analüüs DresD meetodil tuvastas, et kirde-edela suunal asub küllalt lai migratsioonikoridor, kus liikumine toimub küll mõlemal suunal, kuid on tugevam edelast kirdesse (Joonis 3) ning et Liivi laht on oluliseks liikumisbarjääriks, mis tähendab, et Riia linn ja selle läheduses olevad suuremad maanteed ning jõed on olulisteks migratsiooni takistavateks teguriteks. Lisaks tuvastasime ka geneetiliselt kaugete huntide kontaktsoonid, neist ühe Lääne-Eestis ja teise Kura poolsaarel Lätis. Need kontaktsoonid viitavad, et hundid

on neisse paigusse saabunud erinevatest suundadest ja tingitud võib see olla asjaolust, et seal on piisavalt vabu territooriume.



Joonis 3. Ruumistatistilise DresD analüüsiga tuvastatud migratsioonikoridor (sinine – suurem nool näitab, et valdav migratsioon on edelast kirdesse, ja väiksem nool, et vastupidine migratsioon on väiksema intensiivsusega. Keelumärk tähistab migratsioonibarjääri ümber Riia lahe, ning KT tähistab geneetiliselt kaugete isendite kontakttsoone

Kirjandusallikate loetelu

- Keis M, Remm J, Ho SYW, Davison J, Tammeleht E, Tumanov IL, Saveljev AP, Männil P, Kojola I, Abramov AV, Margus T, Saarma U (2012) Complete mitochondrial genomes and a novel spatial genetic method reveal cryptic phylogeographic structure and migration patterns among brown bears in north-western Eurasia. *Journal of Biogeography* (trükis).
- Peakall, R. and Smouse P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6, 288-295
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959
- Wilson GA, Rannala B (2003) Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics*, 163, 1177–1191.