

Keskkonnaagentuur

**Geneetiliste meetodite kasutamine Eesti hundipopulatsiooni
demograafilistes uuringutes**

Lõpparuanne

Töö teostaja: MTÜ Naturalia

Reg. kood 80155975

Vanemuise 46, 51014 Tartu

Leping nr 3.-3/55

Uuring on finantseeritud SA Keskkonnainvesteeringute Keskuse poolt

Tartus, 30.10.2013

Sissejuhatus

Hunt on tippkiskjana oluline nii oma saakloomade arvukuse ühe reguleerijana kui ka marutaudi, kärntõve ja mitmete nii inimestele kui mets- ja koduloomadele eluohtlike haiguste levitajana (sealhulgas ehhinokokoos, kärntõbi, trihhinelloos). 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 ja mitmekesisus.

Materjal ja meetodid

Geneetilise analüüsi teostasime 105 hundi koeproovide alusel, aga hilisemasse analüüsi võtsime ka 219 varem analüüsitud hundi genotüübid. 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

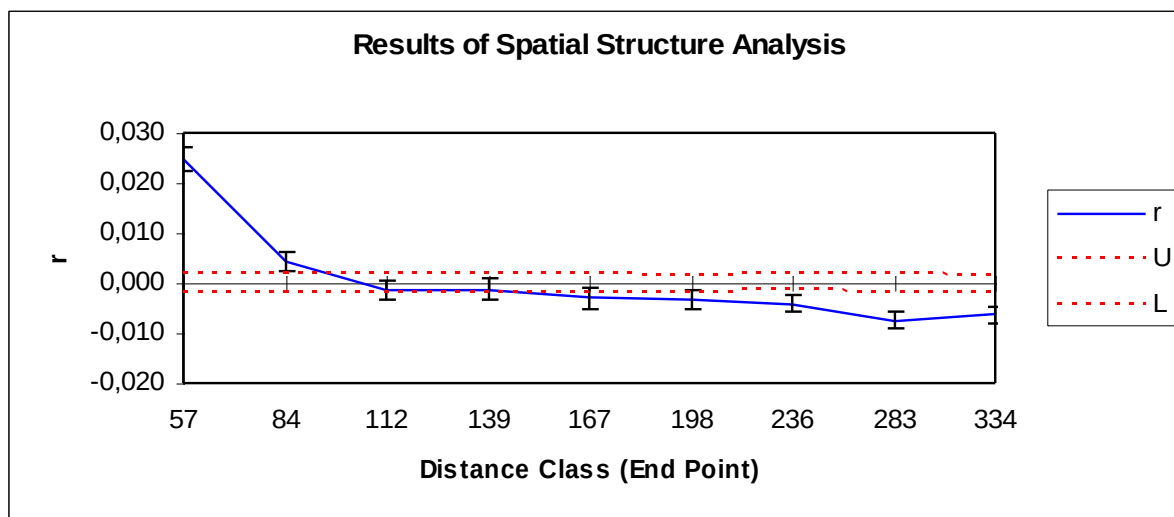
(lookused H200, H10, H17, H54, H79, H208, H209, lookused H213, H250, H253, H466, H642, H130, VWF ning lookused CPH2, CPH4, CPH8, C09.173, CPH12 ja CXX22). Kapillaari segati ka lookuste pikkuse identifitseerimiseks 0,25 µL The GeneScan™ 500 LIZ'i. PCR produktid analüüsiti ABI PRISM 3100 kapillaarsekvenaatoril. Alleelipikkused identifitseeriti programmidega Genemapper v4.0 ja Peak Scanner Software v1.0.

Lõplikesse analüüsidesse kaasati ka varem genotüpeeritud isendeid nii Eestist kui Lätist. Mikrosatelliitide statistiline analüüs viidi läbi programmiga Microsatellite ToolKit , et arvutada, kui mitu alleeli oli iga lookuse kohta valimis esindatud ja kui suur on populatsiooni geneetiline mitmekesisus. Populatsioonis esinevaid geneetilisi mustreid otsiti programmidega Structure 2.3.4 (Pritchard jt. 2000) ja GenAlEx 6.501 (Peakall ja Smouse 2006, 2012).

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 0.74, mis näitab, et geneetiline mitmekesisus hundipopulatsioonis on endiselt kõrge. Klasteranalüüs programmiga Structure näitas, et Eesti-Läti hundipopulatsioon on aja jooksul ühtlustumas, sest võrreldes varasemate aastakäikudega (Hindrikson jt. 2013) väga selgelt eristuvaid geneetilisi gruppe ei tuvastatud. See võib ühest küljest näidata huntide suurenenud segunemist üle uurimisala, aga populatsiooni dünaamikast selgema ülevaate saamiseks on vajalikud edasised uuringud, et näha, kas ühtlustumine on

jätkuv protsess või tekivad taas geneetiliselt eristuvad grupid. Klasterdumist ei näidanud ka assignatsiooni analüüs (*assignment analysis*) programmiga GenAlEx, küll aga ilmnes geneetilisele kliinile iseloomulik positiivne autokorrelatsioon alla 90 km vahekaugusega huntide puhul (Joonis 1); samas üksteisest üle 150 km elavad hundid on seevastu geneetiliselt erinevad. Üsna kõrge heterosügootsuse määr nii hundipopulatsioonis tervikuna kui ka mõlemas riigis eraldi vaadatuna annab märku üsna elujõulisest populatsioonist, samuti ka populatsiooni panmiktilisus, kuid kindlasti tuleks vältida demograafiliste geenisiirde barjääride teket (näit. ülemäärase jahisurve või järjekindla hundikarjade lõhkumise tõttu).



Joonis 1. Eesti-Läti hundipopulatsiooni ruumiline autokorrelatsioon. r - korrelatsioonikordaja, U-ülemine usalduspiir, L-alumine usalduspiir. x-teljel on distants kilomeetrites.

Kirjandusallikate loetelu

- Hindrikson M, Remm J, Männil P, Ozolins J, Tammeleht E, Saarma U (2013). Spatial genetic analyses reveal cryptic population structure and migration patterns in a continuously harvested grey wolf (*Canis lupus*) population in north-eastern Europe. *PLoS ONE* 8(9): e75765. doi:10.1371/journal.pone.0075765.
- Keis M, Remm J, Ho SYW, Davison J, Tammeleht E, Tumanov IL, Saveljev AP, Männil P, Kojola I, Abramov AV, Margus T, Saarma U (2013). 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* 40, 915-927.
- Peakall R, Smouse PE (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.
- Peakall R, Smouse PE (2012). GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.