

Keskkonnaagentuur

**Geneetiliste meetodite kasutamine  
Eesti hundipopulatsiooni demograafilistes uuringutes**

**Lõpparuanne**

**Töö teostaja:** MTÜ Naturalia

Reg. kood 80155975

Vanemuise 46, 51014 Tartu

Leping nr 3-3/135

Projekti teostamise aeg: 1. oktoober 2014. a kuni 30. november 2015. a

Uuring on finantseeritud SA Keskkonnainvesteeringute Keskuse poolt

Tartus, 25.11.2015

## 1. Rakendusuuringu eesmärk

Tellitav uuring on osa hundipopulatsiooni geneetilisest seirest, mille eesmärk on välja selgitada 2010.–2014. a hooaegadel kütitud pesakondade geneetiline seotus (pesakonnasisene ja pesakondadevaheline), kasutades selleks geneetilist mikrosatelliitanalüüsi.

## 2. Materjal ja meetodid

Genoomse DNA eraldasime 168-st kogutud hundiproovist, milleks kasutasime High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). Kõigil proovidel analüüsisime 16 mikrosatelliitlookust: FH2001, FH2010, FH2017, FH2054, FH2079, FH2088, FH2096, vWF, AHT130, M-CPH2, M-CPH4, M-CPH12, C09.173, C466, C20.253 ja CXX22. Mikrosatelliitlookuste analüüsimiseks kasutati polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR), mis viidi läbi 10 mikroliitris (µl) ja reaktsioonisegu koosnes järgnevatest komponentidest: 1U Smart-Taq Hot DNA polümeraas (Naxo Ltd, Tartu, Estonia), 1 × PCR puhver ammoonium sulfaadiga (Naxo Ltd), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 5 pmol praimereid ja 10-50 nanogrammi (ng) eelnevalt puhastatud genoomset DNAd. PCR viidi läbi järgmistel tingimustel:

20 min 95°C

30 sec 94°C

30 sec 58°C (touchdown -0.5°C tsükli kohta)      12 tsüklit

1 min 72°C

30 sec 94°C

30 sec 52°C      18 tsüklit

1 min 72°C

7 min at 72°C

Peale PCRi lahjendati reaktsioonisegu veega (20-ne kordne lahjendus). Proovid koondati edasiseks analüüsiks kolme segu vahel: (1) lookused FH2010, FH2017, FH2054, FH2079, FH2088, FH2096 ja vWF; (2) FH2001, AHT130, C466 ja C20.253; (3) M-CPH2, M-CPH4, M-CPH12, C09.173 ja CXX22. Igale segule lisati 0.2 µl molekulmassi standardit GeneScan™ 500 LIZ (Applied Biosystems). PCRi produktid analüüsiti ABI PRISM 3100 kapillaarsekvenaatoril. Alleelipikkused identifitseeriti programmidega Genemapper v4.0 ja Peak Scanner Software v1.0.

Mikrosatelliit-andmete statistiline analüüs viidi läbi erinevate programmidega. Vigade sagedused määrati programmidega Allelogram (Morin et al. 2009) ja Micro-Checker v2.2.3 (van Oosterhout et al. 2004). Geneetilise mitmekesisuse ja demograafilise pudelikaela näitajad arvutati programmidega Arlequin v3.5.2.1 (Excoffier et al. 2010), Genepop v4.2 (Raymond & Rousset 1995) ja Fstat v.2.9.3 (Goudet et al. 2001). Populatsiooni struktuuri analüüsiti programmidega Structure v2.3.4 (Pritchard et al. 2000) ja Genetix v4.05.2 (Belkhir et al. 2004). Populatsiooni ruumiline analüüs viidi läbi DResD analüüsi abil (Keis et al. 2013; Hindrikson et al. 2013). Efektiivse populatsiooni suurus määrati programmiga LDNe v1.31 (Waples & Do 2006). Isenditevaheline sugulus määrati programmiga ML-Relate (Kalinowski et al. 2006), mis kasutab selleks suurima tõepära (maximum likelihood) meetodit ning arvutab kodominantsete geneetiliste andmete põhjal tõenäolisemad isendipaaridevahelised sugulussuhted (vanem-järglane paarid, õved – st. õed-vennad, kellel on samad vanemad (*full siblings*), poolõved – st. poolõed-poolvennad, kellel on üks ühine vanem (*half siblings*) ja suguluseta isendipaarid). Antud töös vaadeldi ainult vanem-järglane ja õvede paare. Võimalikud sugulussuhtes olevad paarid ühendati kaardil omavahel joontega ning lisaks mõõdeti nendevaheline kaugus kilomeetrites.

Kuna Eestis on varasemalt tuvastatud hundi ja koera hübriide (Hindrikson et al. 2009; Hindrikson et al. 2012), siis selleks, et analüüs sisaldaks vaid „puhtaid hunte“, elimineerisime

kõik geneetilisel analüüsil tuvastatud hübriidikahtlusega isendid, keda oli kokku 21. Algne analüüsitud proovide arv oli seega 189, ent edasisteks hundipopulatsiooni analüüsideks kaasasime 168 isendit.

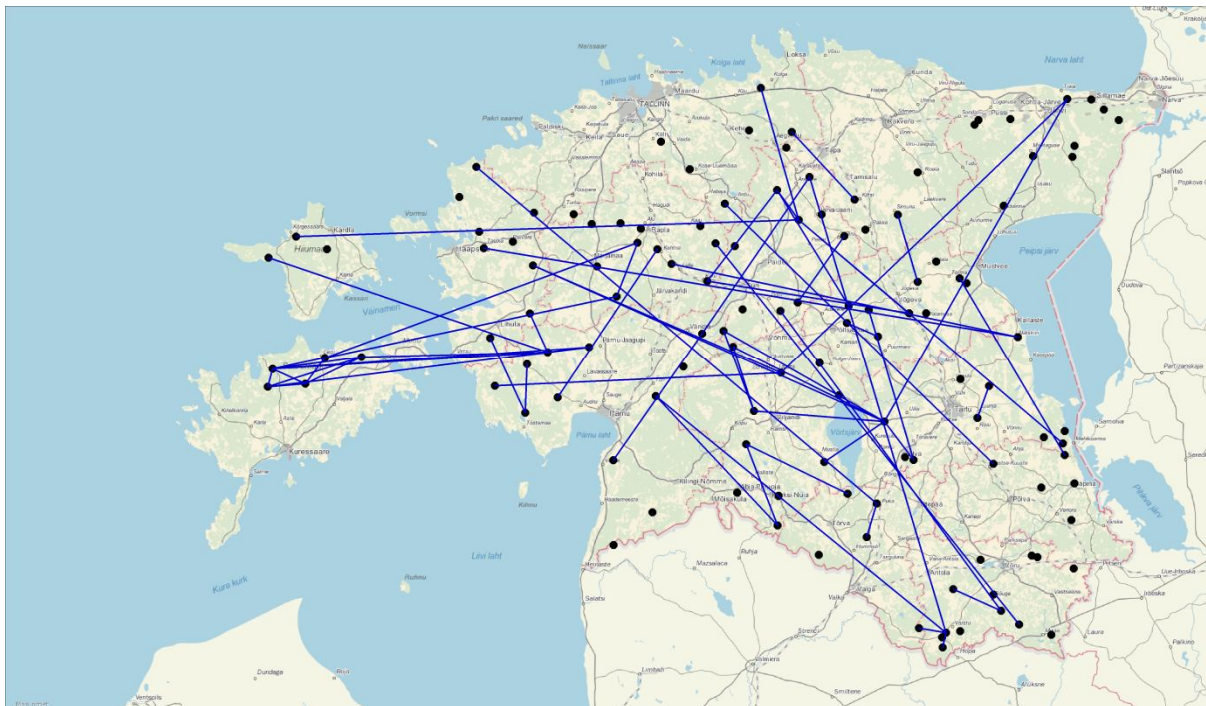
### 3. Tulemused ja arutelu

Hundiproovidel analüüsi tulemusena saadi iga hundi jaoks mikrosatelliitsete alleelide muster ehk „geneetiline pass“, mis lubas edasi analüüsida heterosügootsust ehk geneetilist mitmekesisust, samuti populatsiooni geneetilist struktuuri ja populatsioonis toimuvaid protsesse. Mitte ükski analüüsitud 168-st proovist ei sisaldanud puuduvaid andmeid rohkem kui ühe lookuse kohta. Kuna lookuse FH2079 puhul tuvastati null-allele, siis jäeti see edasisest analüüsist välja. Geneetilise mitmekesisuse näitajate kohta saadi järgmised väärtused: oodatav heterosügootsus ( $H_E$ ) oli 0.67 ja tuvastatud heterosügootsus ( $H_O$ ) oli 0.66, ning keskmine alleelide arv lookuse kohta ( $N_A$ ) oli 6.33. Need näitajad pole küll kuigi kõrged, ent võrreldes teiste Euroopa populatsioonidega siiski üsna keskmisel tasemel. Sugulus-sigimist ehk inbriidingut ei tuvastatud ( $F_{IS} = 0.014$ ;  $P > 0.05$ ) ning efektiivse populatsiooni suuruseks saadi 76.5 (95% CL 69.6-84.5).

Populatsiooni struktuuri analüüs näitas, et hundipopulatsioon jaotub kaheks suuremaks geneetiliselt üksteisest eristuvaks grupiks, mis omavahel kattuvad. Kui aga analüüsida geneetilisse gruppi kuuluvaid isendeid tõenäosuse alusel, siis kõrge kuuluvuskoefitsiendiga isendite jaotumisel ilmnes, et mõlema grupi tuumikalad paiknevad geograafiliselt lahus, üks tuumikala katab peamiselt Eesti lääneosa, ka. Soomaa ja Lääne-Eesti saared: Saaremaa ja Hiiumaa. Teine grupp jääb aga valdavalt Eesti kesk- ja kaguossa. Selline gruppidesse jaotumine viitab, et Eesti hundipopulatsioonis on toimunud rida demograafilisi protsesse, mis on viinud teatava eristumiseni. Arvatavasti on läänepoolne geneetiliselt eristuv grupp seotud

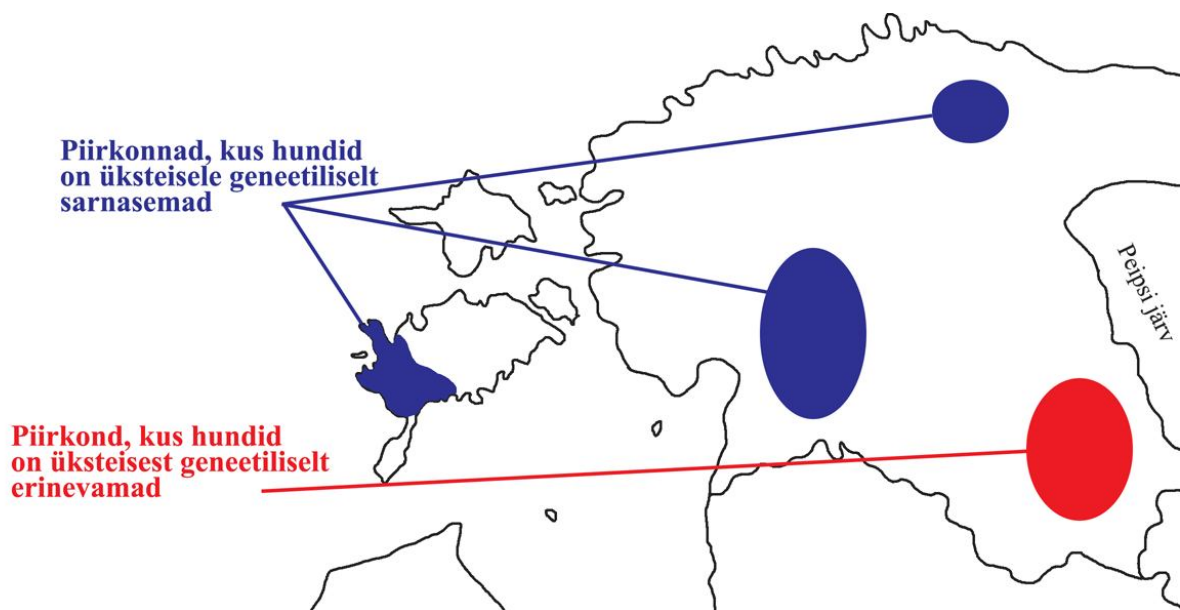
Soomaa hundipopulatsiooniga – seal pole pikka aega huntidele jahti peetud ja hundikarjad on saanud areneda üsna suurteks ja elujõulisteks ning Soomaalt on hundid levinud aja jooksul ka mujale ning jõudnud ka Saaremaale ja Hiiumaale.

Lähisugulusanalüüs tuvastas 54 paari, mille puhul oli teoreetiliselt võimalik nii õvedevaheline sugulus kui ka vanem-järglane sugulussuhe ning viis paari, mille puhul oli võimalik vanem-järglane sugulussuhe (Joonis 1). Keskmiseks arvutuslikuks distantiks lähisugulaste vahel saadi 50 km ning maksimaalseks distantiks 202 km. Saadud andmed näitasid, et Eesti piires liiguvad hundid igasuunaliselt ja ulatuslikult ning mingit olulist takistust huntide migratsioonile ja geenisiirdele Eestis pole. Seega levivad pesakondadest lahkunud isendid Eestis vabalt erinevates suundades. Paaridevahelise geneetiliste kauguste võrdluses olid Saaremaa ja Hiiumaa hundid ülejäänud populatsioonist kõige eristunumad (paaridevaheline  $F_{ST}$  0,049-0,207), mis on seletatav piiratud migratsiooniga saarte ja mandri vahel.



Joonis 1. Lähisuguluspaarid hundil. Sinise ühendusjoonega on tähistatud võimalikud õvede paarid. Üks punkt tähistab ühes jahipiirkonnas kütitud isendeid ja hõlmab enda alla sageli rohkem kui ühe looma.

Eesti hundipopulatsioon on oma levilas geneetiliselt heterogeenne. DResD analüüsi tulemuste põhjal (Joonis 2) esineb kolm piirkonda, kus hundid on üksteisele geneetiliselt sarnasemad kui ülejäänud populatsiooni osades (joonisel märgitud sinisega). Soomaa ja Alutaguse piirkondade puhul on arvatavasti tegemist stabiilsete hundikarjadega, milledesse uute liikmete lisandumine on suhteliselt aeglane, mistõttu on ka isendid geneetiliselt üksteisele lähedasemad. See viitab, et mujal Eestis on hundikarjade struktuur nõrgem, arvatavasti jahisurve ja muu suremuse koosmõjuna, mistõttu ei moodustu tugevaid hundikarju ja karjaga on saanud liituda piisaval hulgal isendeid väljastpoolt. Saaremaa puhul on isendid arvatavasti geneetiliselt sarnasemad seetõttu, et nad on enamikus ühe juhtpaari järeltulijad.



Joonis 2. Ruumistatistilise DResD-analüüsi tulemused Eesti hundipopulatsioonis. Sinised alad näitavad piirkondi, kus isendid on geneetiliselt sarnasemad kui mujal ning punane ala tähistab piirkonda, kus isenditevaheline geneetiline mitmekesisus on suurem kui mujal.

## Kasutatud kirjandus

- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Catch F. 2004. GENETIX., software under Windows TM for the genetics of the populations. Laboratory genome, populations, interactions. CNRS UMR. p. 4.05.2. University of Montpellier II, Montpellier, France.
- Excoffier L, Lischer HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol. Eco. Res. 10: 564-567.
- Goudet J. 2001. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).
- Hindrikson M, Männil P, Ozolins J, Krzywinski A, Saarma U. 2012. Bucking the Trend in Wolf-Dog Hybridization: First Evidence from Europe of Hybridization between Female Dogs and Male Wolves. PLoS ONE. 7: e46465. doi:10.1371/journal.pone.0046465.
- Hindrikson, M; Männil, P; Saarma, U. 2009. Geneetiline analüüs tõestas hundi ja koera hübriidid Eestis. Eesti Loodus, 60(9): 6-13.
- 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: e75765. doi:10.1371/ journal.pone.0075765
- Kalinowski, S.T., Wagner, A.P., & Taper, M.L. 2006. ML-Relate : a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. Molecular Ecology Notes, 6:576-579.
- Keis M, Remm J, Ho SYW, Davison J, Tammeleht E, Tumanov IL. 2013. Complete mitochondrial genomes and a novel spatial genetic method reveal cryptic phylogeographic structure and migration patterns among brown bears in north-western Eurasia. J Biogeogr. 40: 915-927. doi: 10.1111/jbi.12043.
- Morin PA, Manaster C, Mesnick SL, Holland R. 2009. Normalization and binning of historical and multi-source microsatellite data: overcoming the problems of allele size shift with allelogram. Mol Ecol Res. 9: 1451-1455. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02672.x.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly PJ. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. 155: 945-959.
- Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. J Hered. 86: 248-249.
- van Oosterhout C, Hutchinson WF, Willis DPM, Shipley P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol Ecol Notes. 2: 377-379. doi:10.1111/j1471-8286.2002.00684.x.
- Waples RS, Do C. 2006. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. Mol Ecol Resour. 8: 753-756.