



KESKKONNAAGENTUUR

**TAL  
TECH**

# Mandri-Eesti hundipopulatsiooni arvukuse geneetiline uuring

Lõpparuanne



Euroopa Liit  
Ühtekuuluvusfond



Eesti  
tuleviku heaks

 KESKKONNAINVESTEERINGUTE KESKUS

Tallinn 2020

**Projekt:** Ühtekuuluvuspoliitika fondide rakenduskava 2014–2020 tegevus nr 8.1.8 „Elurikkuse sotsiaalmajanduslikult ja kliimamuutustega seostatud keskkonnaseisundi hindamiseks, prognoosiks ja andmete kättesaadavuse tagamiseks vajalikud töövahendid” (ELME projekt; SFOS: 2014-2020.8.01.16-0112).

**Riigihanke viitenumber:** 200710

Leping: töövõtuleping nr 4-5/19/7, 1. märts 2019. a

Tellija: Keskkonnaagentuur, esindaja Madli Linder

Töövõtja: Tallinna Tehnikaülikool, esindaja Maria Cecilia Sarmiento Guerin

## SISUKORD

Sissejuhatus .....	4
1. Eesmärk .....	4
2. Metoodika.....	5
2.1. Proovid.....	5
2.2. DNA eraldus .....	5
2.2.1. Ekskrementid .....	5
2.2.2. Koeproovid .....	5
2.2.3. Süljeproovid.....	6
2.2.4. Vereproovid .....	6
2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR).....	7
2.3.1. 16S PCR.....	7
2.3.2. Soo määramise PCR .....	8
2.3.3. Mikrosatelliitide PCR .....	9
2.4. Fragmentanalüüs.....	12
2.5. Bioinformaatiline analüüs.....	12
3. Tulemused .....	13
3.1. DNA eraldamine .....	13
3.2. Soo määramine .....	14
3.3. Mikrosatelliitlookuste analüüs.....	14
3.4. Alleelide esinemissagedused ja isendite identifitseerimine.....	15
3.5. Huntide populatsiooni kindlaks tegemine .....	16
3.6. Sugulusanalüüs .....	19
Kokkuvõte .....	20
Kasutatud kirjandus.....	21

## Sissejuhatus

Tallinna Tehnikaülikool ja Keskkonnaagentuur sõlmisid 01.03.2019 lepingu nr 4-5/19/7. Lepingu kohaselt kohustus Tallinna Tehnikaülikool kui töövõtja teostama järgmise töö: **Mandri-Eesti hundipopulatsiooni arvukuse geneetiline uuring.**

Käesolev aruanne annab ülevaate selle lepingu täitmisest, lähtudes Keskkonnaagentuuri poolt üle Eesti kogutud proovide geneetilisest analüüsist.

Lepingu kohaselt pidi töövõtja:

- Analüüsima vähemalt 300 ekskremendiproovi;
- Analüüsima vähemalt 50 koeproovi;
- Analüüsima vähemalt 50 koerte vereproovi;
- Analüüsima kuni 30 süljeproovi.

Ette oli nähtud DNA proovidest kolmes kuni viies korduses, lisaks soo määramisele, 17 järgneva mikrosatelliitlookuse analüüs: CPH12, CPH8, AHT137, REN169O18, CPH4, CPH2, C20253, AHTk211, AHT121, AHTH130, C09173, CXX225, CXX279, INRA21, C2001, C2096, C2088.

Huntide arvukuse hindamiseks tuli hundiproovide tulemusi võrrelda koeraproovide omadega ning segase päritoluga proovid edasistest analüüsist eemaldada.

Uuringut kaasrahastasid Euroopa Liidu Ühtekuuluvusfond ja SA Keskkonnainvesteeringute Keskus. Uuring moodustab osa Keskkonnaagentuuri projektist ELME („Elurikkuse sotsiaal-majanduslikult ja kliimamuutustega seostatud keskkonnaseisundi hindamiseks, prognoosiks ja andmete kättesaadavuse tagamiseks vajalikud töövahendid“).

## 1. Eesmärk

Uuringu eesmärgiks oli huntide arvukuse leidmine Mandri-Eestis geneetiliste meetoditega. Uuringu käigus eraldati DNA nii kütitud huntide koeproovidest kui ka mitteinvasiivselt kogutud väljaheiteproovidest. Väheses koguses analüüsiti huntide poolt murtud lammastelt kogutud süljeproove. Kogutud proovide korral analüüsiti 17 mikrosatelliitlookust ja eristati indiviidid. Samuti oli eesmärgiks kogutavat andmestikku kasutades hinnata hundipopulatsiooni arvukust enne ja pärast 2018.–2019. a küttemishooaega.

## **2. Metoodika**

### **2.1. Proovid**

Märtsis ja aprillis 2019. a esitas Keskkonnaagentuur Tallinna Tehnikaülikoolile analüüsiks 432 hundi proovi (329 ekskrementi, 58 koe-, 13 vere- ja süljeproovi, 32 lamba karvade proovi). Lisaks ka 59 koera vereproovi ja 2 šaakali koeproovi. Proovide loetelu on esitatud lisas 1. Kõiki proove, v.a karvaproovid, oli eelnevalt säilitatud -20 °C juures.

### **2.2. DNA eraldus**

#### **2.2.1. Ekskrementid**

Ekskrementidest eraldati genoomne DNA, kasutades *QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit* komplekti, nagu soovitatud Granroth-Wilding *et al.* (2017) artiklis.

1 ml InhibitEX puhvrit pipeteeriti 2 ml tuubi, puhvrise lisati 180-220 mg külmutatud ekskremendi kaape proovi. Proovi homogeniseeriti 1 min jooksul seda vortexil pidevalt segades ning inkubeeriti viis minutit 70 °C juures. Seejärel segati proovi 15 s vortexil ja tsentrifuugiti 14000 rpm juures 1 min. Uude 2 ml tuubi tõsteti 600 µl supernatanti ning lisati 25 µl proteinaas K (10 mg/ml). Lisati 600 µl puhver AL ning proovi segati vortexil 15 s. Proovi inkubeeriti 70 °C juures 10 min ning tsentrifuugiti. Proovile lisati 600 µl 96% etanooli ning segati vortexil. 600 µl proovi kanti *QIAamp* kolonnile ning tsentrifuugiti 14000 rpm juures 1 min. Seda korrati kuni kogu lahus oli kolonni läbinud. Kolonn asetati uude 2 ml tuubi ning kolonni lisati 500 µl puhvrit AW1. Tuubis olevat kolonni tsentrifuugiti 14000 rpm juures 1 min ning kolonn asetati taas uude 2 ml tuubi. Kolonni lisati 500 µl puhvrit AW2, tsentrifuugiti 14000 rpm juures 3 min ning asetati uude 2 ml tuubi. Taas tsentrifuugiti proovi 14000 rpm juures 3 min ning kolonn asetati uude 1,5 ml tuubi. Kolonni lisati 100 µl puhvrit ATE ning inkubeeriti 5 min toatemperatuuril. Kolonni tsentrifuugiti 14000 rpm juures 1 min. Kolonn visati ära ning DNA lahust säilitati -20 °C juures.

#### **2.2.2. Koeproovid**

Koeproovidest eraldati genoomne DNA, kasutades *Macherey-Nagel NucleoSpin® Tissue Kit* komplekti.

25 mg tükeldatud koeproovi kanti 1,5 ml tuubi ning lisati 180 µl T1 puhvrit ja 25 µl proteinaas K (10 mg/ml). Proovi segati vortexil, kuni kõik koetükid olid lahuses. Seejärel inkubeeriti proovi 56 °C juures üleöö loksudes. Proovi segati vortexil ning lisati 200 µl B3 puhvrit. Pärast uut segamist vortexil, inkubeeriti proovi 70 °C juures 10 min (lüüsi etapp). Seejärel lisati 210

µl 96% etanooli. Proovi segati veel vortexil ning kanti *NucleoSpin®Tissue Column* kolonnile kogumistuubis. Proovi tsentrifuugiti 11000 g juures 1 min ning kolonn kanti uude kogumistuubi. Kolonni lisati 500 µl puhvrit BW ning tsentrifuugiti 11000 g juures 1 min. Kogumistuubist eemaldati lahus ning kolonnile kanti 600 µl puhvrit B5. Proovi tsentrifuugiti 11000 g juures 1 min, kogumistuubist eemaldati lahus ning kolonni tsentrifuugiti taas 11000 g juures 1 min. Kolonn asetati uude 1,5 ml kogumistuubi ning kolonnile kanti 100 µl puhvrit BE. Kolonni inkubeeriti 5 min toatemperatuuril ja tsentrifuugiti 11000 g juures 1 min. Kolonn visati ära ning DNA lahust säilitati -20 °C juures.

### **2.2.3. Süljeproovid**

Süljeproovidest eraldati genoomne DNA, kasutades *Macherey-Nagel NucleoSpin® Tissue Kit* komplekti.

Karvatükid asetati 1,5 ml tuubi ning lisati 800 µl 1x PBS. Proovi inkubeeriti 2 tundi 37 °C juures, loksudes 180 rpm. 200 µl lahust kanti uude 1,5 ml tuubi. Proovile lisati 200 µl B3 puhvrit ning 25 µl proteinaas K (10 mg/ml). Proovi segati vortexil ning inkubeeriti 70 °C juures 15 min. Seejärel lisati 210 µl 96% etanooli ning segati taas vortexil. Lahus kanti *NucleoSpin®Tissue Column* kolonnile kogumistuubis. Kolonni tsentrifuugiti 11000 g juures 1 min ning kolonn kanti uude kogumistuubi. Kolonnile lisati 500 µl puhvrit BW ning tsentrifuugiti 11000 g juures 1 min. Lahus eemaldati ning kolonnile kanti 600 µl puhvrit B5. Tsentrifuugiti 11000 g juures 1 min, lahus eemaldati, tsentrifuugiti taas 11000 g juures 1 min ning kolonn asetati uude 1,5 ml kogumistuubi. Kolonnile kanti 60 µl puhvrit BE, inkubeeriti 5 min toatemperatuuril ning tsentrifuugiti 11000 g juures 1 min. Kolonn visati ära ning DNA lahust säilitati -20 °C juures.

### **2.2.4. Vereproovid**

Vereproovidest eraldati genoomne DNA, kasutades *Macherey-Nagel NucleoSpin® Tissue Kit* komplekti.

200 µl vereproovile lisati 25 µl proteinaas K (10 mg/ml) ja 200 µl B3 puhver. Proovi segati vortexil ning inkubeeriti 70 °C juures 15 min. Seejärel lisati 210 µl 96% etanooli ning segati taas vortexil. Lahus kanti *NucleoSpin®Tissue Column* kolonnile kogumistuubis. Kolonni tsentrifuugiti 11000 g juures 1 min ning kolonn kanti uude kogumistuubi. Lisati 500 µl puhvrit BW ning tsentrifuugiti 11000 g juures 1 min. Lahus eemaldati ning kolonnile kanti 600 µl puhvrit B5. Tsentrifuugiti 11000 g juures 1 min, lahus eemaldati, tsentrifuugiti veel 11000 g

juures 1 min ning kolonn asetati uude 1,5 ml kogumistuubi. Kolonnile kanti 60 µl puhvrit BE, inkubeeriti 5 min toatemperatuuril ning tsentrifugeeriti 11000 g juures 1 min. Kolonn visati ära ning DNA lahust säilitati -20 °C juures.

DNA proovide kontsentratsiooni ja puhtuse määramiseks kasutati NanoDrop 2000c spektrofotomeetrit. Puhtust hinnati optiliste tiheduste suhete alusel (OD 260/280 ja OD 260/230).

## **2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)**

### **2.3.1. 16S PCR**

PCR inhibiitorite esinemise välistamiseks ja bakteriaalse DNA esinemise kontrollimiseks ekskrementidest eraldatud DNA lahuses analüüsiti bakteriaalse DNA olemasolu. PCRil kasutati järgnevaid praimerid:

341.f 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG

805.r 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC

PCR programm oli järgnev: DNA denaturatsioon 95 °C 2 min; järgnes 35 tsüklit: 95 °C DNA denaturatsioon 40 s, 55 °C praimerite seondumine 40 s ning DNA süntees 72 °C 1 min. Lõpp-pikendamine 72 °C 5 min.

PCR segu:

Genoomne DNA	30 ng
2x Qiagen multiplex PCR master mix	1x
praimer 341.f	30nM
praimer 805.r	30nM
mQ vesi	Kuni 12µl

Negatiivseks kontrolliks oli iga PCRi masinatäie kohta üks proov, kuhu lisati vett genoomse DNA asemel.

Produktid lahutati 1% agarosgeelil TAE puhvris. Õige produkti pikkus (464 aluspaari) näitas bakteriaalse DNA olemasolu.

### 2.3.2. Soo määramise PCR

Soo määramiseks kasutati Granroth-Wilding *et al.* (2017) poolt publitseeritud protokoll.

PCR reaktsioon viidi läbi lõppmahus 10 µl, mis sisaldas 3 µl genoomset DNA proovi, 2x Qiagen multiplex PCR master mix (lõppkontsentratsioon 1x), 30 nM praimereid DBX6Bint6.fw ja DBX6Bint6.rev ning 20 nM praimereid DBYint7.fw ja DBYint7.rev.

PCR programm oli järgnev: DNA denaturatsioon 95 °C 15 min; 20 tsüklit 94 °C DNA denaturatsioon 30 s, praimerite seondumine 1,5 min ning temperatuuri langetati iga tsükliga 0,2 °C võrra alates 60 °C, DNA süntees 72 °C 1 min. Järgnes 25 tsüklit: 94 °C DNA denaturatsioon, 30 s praimerite seondumine 1,5 min 55 °C ning DNA süntees 1 min 72 °C Lõpp-pikendamine 60 °C 30 min.

PCR segu:

Genoomne DNA	3 µl
2x Qiagen multiplex PCR master mix	1x
praimer DBX6Bint6.fw	30nM
praimer DBX6Bint6.rev	30nM
praimer DBYint7.fw	20nM
praimer DBYint7.rev	20nM
mQ vesi	Kuni 10 µl

PCR programm:

95 °C	15 min	
94 °C	30 s	20x
60 °C -0,2 °C alandamine igas tsükli	1,5 min	
72 °C	1 min	
94 °C	30 s	
55 °C	1,5 min	25x
72 °C	1 min	
60 °C	30 min	

Negatiivseks kontrolliks oli iga PCRi masinatäie kohta üks proov, kuhu lisati vett genoomse DNA asemel.

Produktid lahutati 2% agarosgeelil TAE puhvril. Soo määramiseks hinnati X ja Y spetsiifiliste produktide esinemist.



### 2.3.3. Mikrosatelliitide PCR

#### 2.3.3.1. Ekskrementid ja süljeproovid

Ekskrementidest ja süljeproovidest eraldatud DNA proove analüüsiti viies korduses. Kasutati Granroth-Wilding *et al.* (2017) poolt publitseeritud protokoll ja praimereid nelja fluorestseeruva värviga (VIC, FAM, NED, PET). PCRi segud on toodud tabelites allpool. Ekskrementide proovide puhul lisati PCRi segusse alati 3 µl genoomset DNAd ning süljeproovide puhul 1,5 µl.

#### Multipleks PCR 1:

Genoomne DNA	3 µl/1,5 µl
DreamTaq Hot Start DNA Polymerase 2x	1x
CPH 4 F	10nM
CPH 4 R	10nM
CPH 12 F	20nM
CPH 12 R	20nM
CPH 8 F	20nM
CPH 8 R	20nM
BSA	2mg/ml
mQ vesi	Kuni 12 µl

#### Multipleks PCR 2:

Genoomne DNA	3 µl/1,5 µl
DreamTaq Hot Start DNA Polymerase 2x	1x
C 2001 F	10nM
C 2001 R	10nM
AHT 137 F	20nM
AHT 137 R	20nM
C 2088 F	20nM
C 2088 R	20nM
BSA	2mg/ml
mQ vesi	Kuni 12 µl

#### Multipleks PCR 3:

Genoomne DNA	3 µl/ 1,5 µl
DreamTaq Hot Start DNA Polymerase 2x	1x
C 2096	10nM
C 2096	10nM
C 20253	10nM
C 20253	10nM
CPH 2	20nM
CPH 2	20nM
AHTk211	20nM
AHTk211	20nM
BSA	2mg/ml
mQ vesi	Kuni 12 µl

#### Multipleks PCR 4:

Genoomne DNA	3 µl/1,5 µl
DreamTaq Hot Start DNA Polymerase 2x	1x
REN 16901 F	20nM
REN 16901 R	20nM
BSA	2mg/ml
mQ vesi	Kuni 12 µl

### Multipleks PCR 5:

Genoomne DNA	3 µl/1,5 µl
DreamTaq Hot Start DNA Polymerase 2x	1x
AHT 121	10nM
AHT 121	10nM
CXX 225	10nM
CXX 225	10nM
INRA 21	10nM
INRA 21	10nM
AHTH 130	20nM
AHTH 130	20nM
C 09173	20nM
C 09173	20nM
CXX 279 F	20nM
CXX 279 R	20nM
BSA	2mg/ml
mQ vesi	Kuni 12 µl

### PCR programm:

95 °C	3 min	
95 °C	30 sek	40x
60 °C	90 sek	
72 °C	60 sek	
60 °C	30 min	
4 °C	∞	

### 2.3.3.2. Vere- ja koeproovid

Vere- ja koeproove analüüsiti kolmes korduses. Kasutati Granroth-Wilding *et al.* (2017) poolt publitseeritud protokoll ja praimereid nelja fluorestseeruvat värvi (VIC, FAM, NED, PET). PCRi segud on toodud tabelites allpool.

Multipleks PCR 1:

Genoomne DNA	30 ng
DreamTaq Hot Start DNA Polymerase 2x	1x
CPH 12	40nM
CPH 12	40nM
CPH 8	40nM
CPH 8	40nM
C 2001	40nM
C 2001	40nM
AHT 137	40nM
AHT 137	40nM
REN 169018	40nM
REN 169018	40nM
mQ vesi	Kuni 12 µl

Multipleks PCR 2:

Genoomne DNA	30 ng
DreamTaq Hot Start DNA Polymerase 2x	1x
CPH 2 F	10nM
CPH 2 R	10nM
C 2096 F	10nM
C 2096 R	10nM
C 20253 F	10nM
C 20253 R	10nM
AHTk211 F	20nM
AHTk211 R	20nM
C 2088 F	20nM
C 2088 R	20nM
CPH 4 F	40nM
CPH 4 R	40nM
BSA	2mg/ml
mQ vesi	Kuni 12 µl

Multipleks PCR 3:

Genoomne DNA	30 ng
DreamTaq Hot Start DNA Polymerase 2x	1x
AHT 121	10nM
AHT 121	10nM
CXX 225	10nM
CXX 225	10nM
INRA 21	10nM
INRA 21	10nM
AHTH 130	20nM
AHTH 130	20nM
C 09173	20nM
C 09173	20nM
CXX 279 F	20nM
CXX 279 R	20nM
BSA	2mg/ml
mQ vesi	Kuni 12 µl

PCR programm:

95 °C	3 min	40x
95 °C	30 sek	
60 °C	90 sek	
72 °C	60 sek	
60 °C	30 min	
4 °C	∞	

## 2.4. Fragmentanalüüs

Fragmentanalüüs viidi läbi kapillaarelektroforeesi meetodil, milleks segati ekskrementide ja süljeproovide korral paneel A ja paneel B alljärgnevalt:

	PCR1	PCR2	PCR3	PCR4	PCR5	mQ
Paneel A	3 µl	2 µl	1 µl	2 µl		5 µl
Paneel B					1,5 µl	5 µl

Vere- ja koeproovide korral olid segud järgnevad:

	PCR1	PCR2	PCR3	mQ
Paneel A	1,5 µl	1,5 µl		80 µl
Paneel B			1,5 µl	100 µl

PCR produktid (2 µl) segati 10 µl *HiDi* formamiidiga ja 0.1 µl *GS-600LIZ (ABI) size* standardiga. Segu denatureeriti 3 min 95 °C juures. Kapillaarelektroforees viidi läbi Tartu Ülikooli Genoomika Instituudis, kasutades seadet *ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (ABI)*.

## 2.5. Bioinformaatiline analüüs

Kasutati programme, mida on mainitud järgnevates artiklites: Granroth-Wilding *et al.*, 2017; Plumer *et al.*, 2016; Plumer *et al.*, 2018.

Alleelid tehti kindlaks programmidega Peak Scanner 2 1.0 ja Genemarker 2.6.3. Kahte programmi kasutati paralleelseks kontrollimiseks. Fragmentanalüüs loeti õnnestunuks, kui 11 või rohkem lookust olid amplifitseerunud, nagu kirjeldatud Granroth-Wilding *et al.* (2017) poolt. Piikide analüüsiks ja konsensususe määramiseks kõrvutati nii Genemarker 2.6.3. kui ka Peak Scanner 2 1.0 programmidega kõik kordused iga proovi kohta eraldi. Käsitsi eristati piigid, mis usaldusväärselt eristusid taustast. Lookus loeti homosügootseks, kui neli viiest kordusest (või kolm kolmest kordusest) andsid sama tulemuse. Heterosügootseks loeti lookused, kus kolm viiest kordusest (või kaks kolmest kordusest) andsid sama tulemuse. Edasistest arvutustest jäeti välja lookused, mille homotsügootsus või heterotsügootsus oli küsitav (märgistati null väärtusega). Lisaks konsensususele hinnati ka piikide profiili morfoloogiat.

**Cervus 3.0.7** programmi kasutati hundi indiviidide tuvastamiseks, alleelisageduste arvutamiseks ning sugulusanalüüsiks.

Nii täpse („*exact match*“) kui osalise vaste („*fuzzy mismatch*“) puhul eemaldati väiksema arvu lookustega isend vältimaks alleelisageduste arvutamisel vigu, tingituna sellest, et sama isend

esineb rohkem kui üks kord. Täpne vaste tähendab seda, et tulemuslike proovide lookused kahe proovi vahel ei eristu. Antud juhul esineb osaline vaste siis, kui erinevus kahe proovi kahe eri lookuse vahel on ühes või kahes positsioonis.

Hilisemaks suguluse analüüsiks kasutati järgnevaid parameetreid:

Järglasi: 100 000; emaste kanditaate: 200; isaste kanditaate: 200; minimaalne lookuste arv: 11; tõenäosustase (Delta): 95% (tugev ehk *strict*) ja 80% (nõrk ehk *relaxed*).

Populatsioonide FCA (*factorial correspondence analysis*) arvutati programmiga **Genetix 4.05.2**. Tulemustele vastavalt eemaldati hundi proovide hulgast segase päritoluga proovid ehk potentsiaalsed koera või koera-hundi hübriidide proovid.

Samuti viidi Cervus 3.0.7 programmiga läbi sugulusanalüüs, kus hinnati huntide proovide kõige tõenäolisemat päritolu. Lõpphinnangu andmise esmaseks parameetriks oli trio mittekokkulangevuste arv 0. Kõik triod kontrolliti üle ja koostati sugupuud. Võeti arvesse ainult triod, mille puhul vanemate sugu oli määratud.

### **3. Tulemused**

#### **3.1. DNA eraldamine**

Esitatud proovidest eraldati DNA. Eraldatud DNA kvaliteet hinnati nii DNA kontsentratsiooni kui ka puhtusnäitajate järgi (vt lisa 1).

Eeldatavalt oli ekskrementidest eraldatud DNA kvaliteet madal (madalad DNA kontsentratsioonid ja madalad puhtusnäitajad). DNA eraldamist korrati problemaatiliste proovide testimiseks kuni 4 korda.

Koerte vereproovidest (59 tk) ja šaakalide koeproovidest (2 tk) eraldatud DNA oli kvaliteetne (kõrgemad kontsentratsioonid ja puhtuse näitajad võrreldes teiste proovidega).

Ekskrementide proovide puhul viisime läbi lisakontrollina bakteriaalse DNA esinemise testi, et olla kindlad PCRi reaktsioonide inhibitsiooni puudumises inhibiitorite tõttu. 16S PCRi analüüs oli tulemuslik (tuvastati 464 aluspaari pikkune produkt), mis oli aluseks mikrosateliitmarkerite analüüsiga jätkamisele.

Kokkuvõtteks DNA eraldusprotokollid töötasid ja analüüsitav materjal oli piisav.

### **3.2. Soo määramine**

Kokku analüüsiti soo määramiseks 432 hundi- ja 2 šaakaliproovi. Sugu jäi tuvastamata 27,6% puhul (120 proovi ning 72,4%-l oli võimalik sugu tuvastada (314 isendit). Saadud tulemuste alusel oli isastele kuuluvaid proove 68,8 % (215 hunt ja üks šaakal) ja emastele kuuluvaid proove 31,2 % (97 hunt ja üks šaakal). Soo määramiseks visualiseeriti PCR produktid agarosgeelil, mis on vähem tundlikum, kui fluorestsentsmärgistega PCRi produktide tuvastamine, mida kasutati mikrosatelliitlookuste analüüsil.

Soo määramise tulemused kinnitavad, et „šaakal 1“ oli emane ja „šaakal 2“ oli isane. Mõlemad loomad leiti Pärnumaalt (vt lisa 2).

### **3.3. Mikrosatelliitlookuste analüüs**

Koe- ja vereproovide mikrosatelliitlookusi (CPH12, CPH8, AHT137, REN169O18, CPH4, CPH2, C20253, AHTk211, AHT121, AHTH130, C09173, CXX225, CXX279, INRA21, C2001, C2096, C2088) analüüsiti kolmes korduses, väljaheite- ja süljeproove viies korduses. Tulemused on toodud tabelis 2.

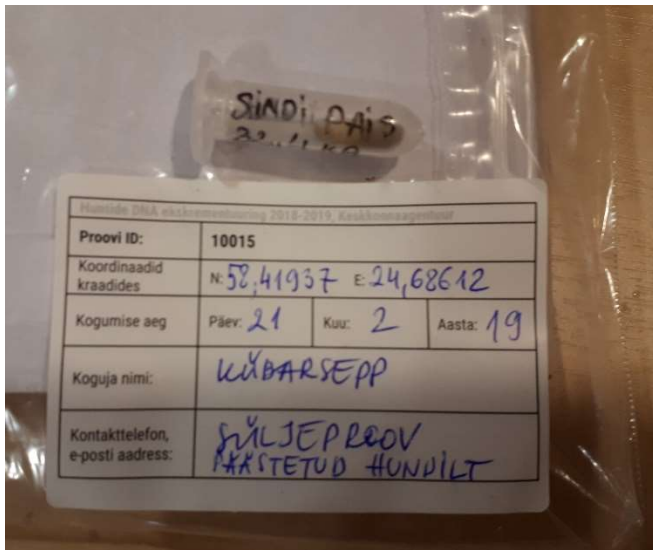
Mikrosatelliitide lookuste analüüsiks kasutati kõiki 419 hundiproovi ning kõiki koerte- ja šaakaliproove, kasutades interpreteerimiseks Peak Scanner 2 1.0 ja Genemarker 2.6.3 programme (vt tabel 2 ja lisa 2).

Mikrosatelliitlookuste analüüsi tulemusi peeti tulemuslikuks ehk sobivaks alleelide esinemissageduse arvutamiseks ning isendite analüüsi sisendiks, kui 11 või rohkem lookust oli amplifitseerunud.

Tulemuslikkus oli koerte- ja šaakaliproovide puhul 100 % ehk kõik proovid sobisid edasiseks analüüsiks.

Hundiproovide mikrosatelliitlookuste analüüsitulemuslikkus oli ekskrementide proovide korral 19,1 % (63 proovi), koeproovide korral 67,2%, (39 proovi) vere- ja süljeproovide korral 30,8% (4 proovi) ning karvadelt eraldatud süljeproovide puhul 9,4% (3 proovi). See tähendab, et 25,2% hundiproovist (109 proovi) õnnestus tuvastada 11 või rohkem lookust.

Madal tulemuslikkus võib olla mõjutatud proovide kogumismetoodika rakendamisest. Ent positiivse näitena võib tuua proovi 10015, kus proovi kogumiseks kasutati tampooni (vt joonis 1) ja tuvastati 15 lookust.



**Joonis 1.** Tampooniga kogutud süljeproov.

### 3.4. Alleelide esinemissagedused ja isendite identifitseerimine

Alleelide esinemissageduste arvutamiseks ja indiviidide identifitseerimiseks kasutati programmi Cervus 3.0.7 (vt lisa 2 ja lisa 3).

Vältimaks korduvaid genotüüpe edasises analüüsis, eemaldati täpset vastet omavate proovide puhul vähemate lookustega isendid. Osalist vastet omavates gruppides jälgiti, et alles jääks kõrgeima lookuste arvuga isend (vt lisa 4). Kokku leiti 12 täpset vastet ja 7 osalist vastet, mis näitasid kokkulangevust ekskrementide proovide korral (vt lisad 2 ja 4 ning tabel 2).

Cervus 3.0.7 programmi kasutati ka peale populatsioonide FCA arvutamist, selleks et välja jätta isendid, mille genotüübid kattuvad (eelmainitud täpsed ja osalised vasted), kui ka isendid, kes ei kuulu selgesti hundipopulatsiooni (seletatud punktis 3.5). Tulemuseks saadi lõplikud alleelide esinemissagedused (vt lisa 5). Leitud heterosügootsuse (HObs) ja eeldatava heterosügootsuse (HExp) väärtused on toodud tabelis 1.

**Tabel 1. Kõigi lookuste leitud heterosügootsuse (HObs) ja eeldatava heterosügootsuse (HExp) väärtused**

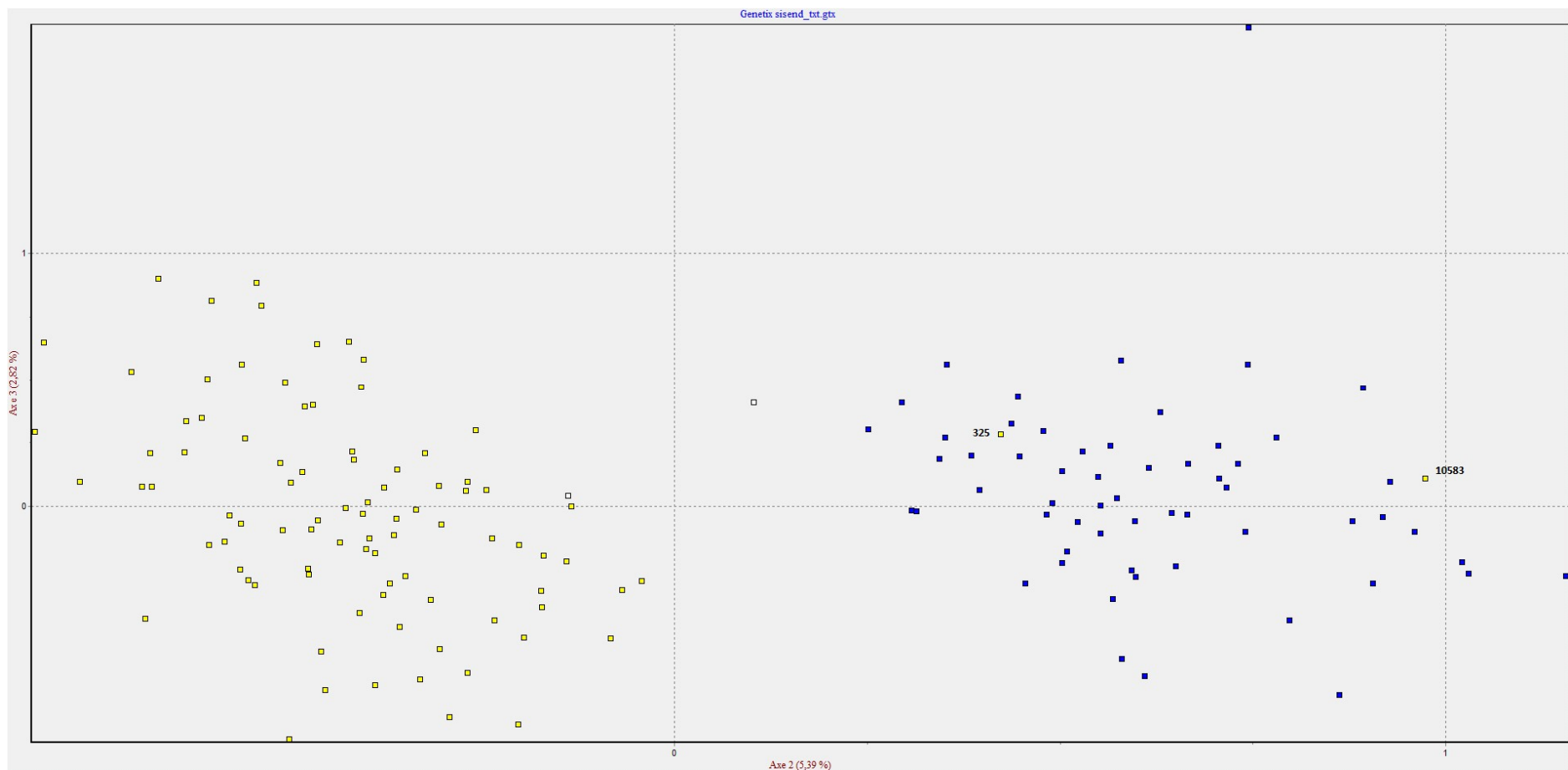
Locus	HObs	HExp
CPH2	0,718	0,748
CPH4	0,671	0,736
CPH12	0,64	0,601
C20253	0,697	0,794
C2001	0,718	0,712
CPH8	0,682	0,774
C2096	0,667	0,723
AHT137	0,828	0,824
AHTk211	0,675	0,692
C2088	0,667	0,749
REN169O18	0,736	0,761
AHTH130	0,893	0,85
CXX225	0,714	0,663
AHT121	0,442	0,834
INRA21	0,826	0,793
CXX279	0,81	0,827
C09173	0,782	0,768

### 3.5. Huntide populatsiooni kindlaks tegemine

Populatsioonide FCA (factorial correspondence analysis) analüüs viidi läbi programmiga Genetix 4.05.2 ja tulemused on toodud joonisel 2. Sisendiks kasutati 90 hundi proovi, 59 koera proovi ja 2 šaakali proovi (vt tabel 2). FCA tulemustest lähtuvalt eemaldati edasistest analüüsides proovid 325 (karvadelt oletatavalt hundi süljeproov) ja 10583 (ekskremendiproov), mis on potentsiaalset koera või koera-hundi hübriidi proovid.

Analüüsitulemustest lähtuvalt eristati kokku 88 hunti (44 isast, 42 emast ja kahe puhul jäi sugu määramata), mis osutab kaudselt Mandri-Eesti huntide minimaalsele arvukusele (vt tabel 2).





**Joonis 2.** Programmiga Genetix 4.05.2 läbi viidud FCA (*factorial correspondence analysis*) analüüs. Huntide populatsioon- kollane, koerte populatsioon- sinine, šaakalid- valge. Numbritega on märgistatud proovid, mis edasisest analüüsist eemaldati.

**Tabel 2. Eristatud isendite arvu saamise etapid**

	<b>Estatud proovid</b>	<b>DNA eraldamine tehtud</b>	<b>Fragmentanalüüs tehtud (kordused)</b>	<b>Tulemuslik fragmentanalüüs*</b>	<b>Täpne vaste</b>	<b>Osaline vaste**</b>	<b>Hundi-populatsiooni mitte kuuluvad isendid</b>	<b>Eristatud isendid</b>
<b>Hundi ekskremendid</b>	329	329	329 (5x)	63	12	7	1	43
<b>Karvadelt hundi süljeproovid</b>	32	32	19 (5x)	3			1	2
<b>Hundi koeproovid</b>	58	58	58 (3x)	39				39
<b>Hundi vere- ja süljeproovid</b>	13	13	13 (5x)	4				4
<b>Huntide proovid KOKKU</b>	<b>432</b>	<b>432</b>	<b>419</b>	<b>109</b>	<b>97</b>	<b>90</b>	<b>88</b>	<b>88</b>
<b>Šaakali koeproovid</b>	2	2	2 (3x)	2				2
<b>Koerte vereproovid</b>	59	59	59 (3x)	59				59

\*11 või rohkem lookust on amplifitseerunud

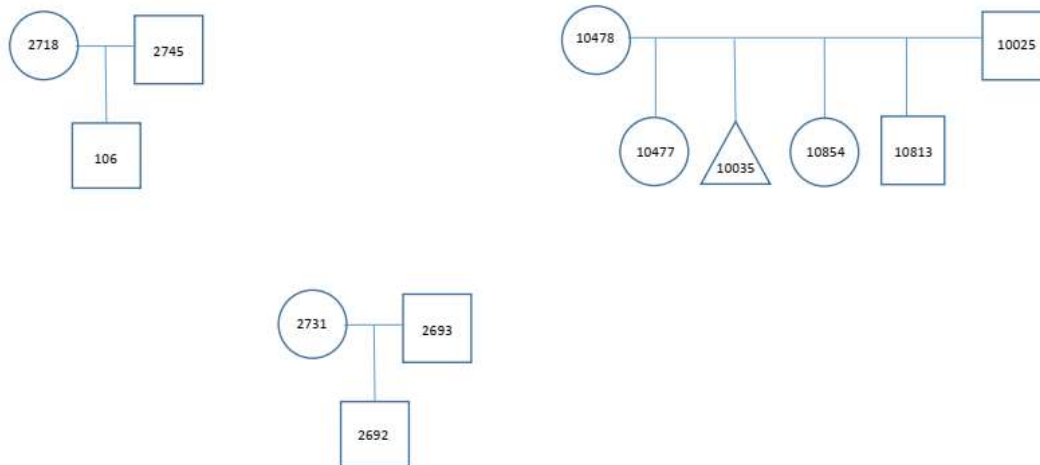
\*\* erinevus kahe lookuse vahel oli ühes või kahes positsioonis

### 3.6. Sugulusanalüüs

Cervus 3.0.7 programmiga tuvastati kolm võimalikku emane, isane ja kutsikad triot (vt lisa 6 ja joonis 3).

Järglaste analüüsist eemaldati võimalike emastena ja isastena proovid, kus sugu ei olnud teada, järglastena olid proovid kaasatud. Toodud on need sugupuud, kus puudusid mittekokkulangevused. Erandiks on trio 2731-2693-2692, kus leiti üks mittekokkulangevus. Tulemuste üle vaatamine kinnitas kõikide eelnimetatud proovide heterosügootsust lookuses CXX225. Mittekokkulangevus võib olla tingitud alleelide pikkuse ümardamisest täisarvudeks. Varasemalt on kirjanduses näidatud, et alleelide määramine pikkuste alusel alleelsete redelite puudumisel, seda eriti dinukleotiidsete korduste määramiseks, võib olla mõjutatud konkreetsest seadmest.

Ühte pesakonda kuuluvate isendite proovid on kogutud lähikonnast, välja arvatud trio 2718-2745-106, kus isase hundi proov talletati Raplast, ent emase ja kutsika proovid pärinesid Tartumaalt.



**Joonis 3. Sugupuud.** Ruudud: isased hundid; ringid: emased hundid; kolmnurk: sugu pole teada.

## **Kokkuvõte**

Uuringu eesmärgiks oli huntide arvukuse leidmine Mandri-Eestis geneetiliste meetoditega. Märtsis ja aprillis 2019 esitas Keskkonnaagentuur Tallinna Tehnikaülikoolile analüüsiks 432 hundi päritolu proovi (329 ekskrementi, 58 koe-, 13 vere- ja süljeproovi ning oletatavalt huntide poolt murtud 32 lamba karvaproovi). Lisaks esitati 59 koera vereproovid ja 2 šaakali koeproovid. Eraldati DNA ja analüüsiti järgnevaid mikrosatelliitlookusi Peak Scanner 2 1.0 ja Genemarker 2.6.3. programmide abil: CPH12, CPH8, AHT137, REN169O18, CPH4, CPH2, C20253, AHTk211, AHT121, AHTH130, C09173, CXX225, CXX279, INRA21, C2001, C2096, C2088. Ekskrementidest ja süljeproovidest eraldatud DNA proove analüüsiti viies korduses, vere- ja koeproove kolmes korduses. Alleelide esinemissageduse arvutamiseks ning isendite identifitseerimiseks kasutati proove, kus vähemalt 11 lookust oli amplifitseerunud. Lookus loeti homosügootseks, kui neli viiest kordusest (või kolm kolmest kordusest) andsid sama tulemuse. Heterosügootseks loeti lookused, kus kolm viiest kordusest (või kaks kolmest kordusest) andsid sama tulemuse. Edasistest arvutustest jäeti välja lookused, mille homotsügootsus või heterotsügootsus oli küsitav. Nende kriteeriumite alusel õnnestus 11 või rohkem lookust tuvastada 25,2% hundiproovidest (kokku 109), sealhulgas 63 ekskrementi proovi. Isendite identifitseerimise käigus leiti 12 proovi, mille genotüübid kattusid täielikult ja 7, mille kattuvus oli osaline (erinevus kahe lookuse vahel oli ühes või kahes positsioonis). Kõik kattuvate genotüüpidega proovid tulenesid ekskrementidest. Huntide tuvastamiseks, alleelisageduste arvutamiseks ning sugulusanalüüsiks kasutati Cervus 3.0.7 programmi. Populatsioonide FCA arvutati programmiga Genetix 4.05.2. Tulemustele vastavalt eemaldati hundi proovide hulgast 2 proovi, mis olid potentsiaalsed koera või koera-hundi hübriidid. Kokku eristati eelmainitud kriteeriumite järgi 88 hunti, mis on 2018/2019 aastal minimaalne huntide arvukus Mandri-Eestis. Võimalike sugupuude tuvastamiseks viidi läbi sugulusanalüüs.

## **Kasutatud kirjandus**

Granroth-Wilding H, Primmer C, Lindqvist M, Poutanen J, Thalmann O, Aspi J, Harmoinen J, Kojola I, Laaksonen T (2017) Non-invasive genetic monitoring involving citizen science enables reconstruction of current pack dynamics in a re-establishing wolf population. *BMC Ecol* 17(44):1–15. doi.org/10.1186/s12898-017-0154-8.

Hindrikson M, Remm J, Männil P, Ozolins J, Tammeleht E, Saarma U. 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*. 2013;8(9):e75765. Published 2013 Sep 19. doi:10.1371/journal.pone.0075765.

Plumer L, Keis M, Remm J, et al. Wolves Recolonizing Islands: Genetic Consequences and Implications for Conservation and Management. *PLoS One*. 2016;11(7):e0158911. Published 2016 Jul 6. doi:10.1371/journal.pone.0158911.

Plumer, L., Talvi, T., Männil, P. *et al.* Assessing the roles of wolves and dogs in livestock predation with suggestions for mitigating human–wildlife conflict and conservation of wolves. *Conserv Genet* **19**, 665–672 (2018) doi:10.1007/s10592-017-1045-4.