TARTU ÜLIKOOL

ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT

ZOOLOOGIA OSAKOND

TERIOLOOGIA ÕPPETOOL

Kristiina Amur

Eesti huntide populatsioonigeneetika ja piiriülene seotus Vene Föderatsiooni populatsiooniga

Magistritöö

Juhendajad: Maris Hindrikson (PhD)

Egle Tammeleht (PhD)

Kaari Susi (MSc)

TARTU 2025

Infoleht

Hunt (*Canis lupus*) on bioloogiliselt mitmekesise ja terve ökosüsteemi indikaatorliik ja seepärast on liigi populatsiooni elujõulisus tähtis. Eriti oluline on uurida Eesti hundipopulatsiooni, millele mõjub üks kõrgemaid jahisurveid Euroopas. Töö eesmärgiks on tuvastada Eesti hundipopulatsiooni struktuur, geneetiline mitmekesisus ja selgitada välja, kas ja kui suur võiks olla Eesti huntide seos kõrvalasuva Vene Föderatsiooni huntide asurkonnaga. Antud töös leiti, et Eesti hundipopulatsioon jaguneb geneetiliselt kaheks, on endiselt geneetiliselt mitmekesine ja Kagu-Eestis on viimasel aastakümnel toimunud mõningal määral geenisiire. Tugeva jahisurve ning piiriaedade ehituse tõttu Eesti-Vene piirialadel peaks ka edaspidi jätkama Eesti hundiasurkonna populatsioonigeneetika uurimist Eestis, tuvastamaks tõenäolisi ohte Eesti huntide geneetiliselt heale seisundile.

Märksõnad: hunt (*Canis lupus*), populatsioonigeneetika, mikrosatelliitmarkerid, Eesti hundipopulatsioon, geenisiire, piiriülene liikumine

Abstract

Grey wolf (*Canis lupus*) is an indicator species for a biologically diverse and healthy ecosystems, making the viability of its population crucial. The Estonian wolf population is particularly important to study, as it is subject to one of the highest hunting pressures in Europe. The aim of this study was to determine the population structure and genetic diversity of Estonian wolves and to assess if gene flow occurs from neighboring Russian population and if this is the case, how strong it is. The findings indicate that the Estonian wolf population is genetically divided into two clusters, remains genetically diverse, and has experienced some gene flow in southeastern Estonia over the past decade. Due to strong hunting pressure and the construction of border fences along the Estonian-Russian border, continued research on the population genetics of Estonian wolves is necessary to identify potential threats to the genetic integrity of Estonia's wolf population.

Keywords: wolf (*Canis lupus*), population genetics, microsatellite markers, Estonian wolf population, gene flow, transboundary movement.

Sisukord

Sisukord 5
Sissejuhatus 6
1. Ülevaade Euroopa hundipopulatsioonidest ja nende uurimisest 8
1.1 Huntide populatsioonigeneetika Euroopas ja Balti populatsiooni naaberpopulatsioonides 8
1.2 Eesti huntide populatsioonigeneetika 11
2. Populatsioonigeneetikat mõjutavad tegurid 13
2.1 Jahisurve 13
2.2 Füüsilised tõkked ja piiriaiad 14
3. Materjal ja meetodid 15
3.1 Proovid 15
3.2 Vaatlusandmed huntide liikumisest Eesti-Vene piiril 16
3.3 Väljaheiteproovide ettevalmistamine 16
3.4 DNA eraldamine, sekveneerimine ja liigi tuvastamine 17
3.5 Mikrosatelliitmarkerite analüüs 18
3.6 Andmeanalüüs 19
3.7 Autori roll 21
4. Tulemused 22
4.1 Eesti hundipopulatsiooni geneetiline struktuur ja geneetiline mitmekesisus 22
4.2 Ajaline populatsioonigeneetiline dünaamika ja statistilised näitajad 25
4.3 Muud analüüsid 27
4.4 Vaatlusandmete kokkuvõte 29
5. Arutelu 31
Kokkuvõte 34
Summary 35
Tänuavaldused 37
Kasutatud kirjandus 38

Sissejuhatus

Geneetiline mitmekesisus on imetajatele väga oluline kohastumisvõime seisukohalt. Mida suurem on geneetiline varieeruvus, seda suurem on tõenäosus, et populatsioon suudab kohaneda muutuvate keskkonnatingimustega. Geneetiliselt vaesunud loomapopulatsiooni ohuks on väiksem tõenäosus kohaneda ja toime tulla erinevate haigustega. Samuti on madala geneetilise mitmekesisusega populatsiooni sees suurem oht inbriidingu esinemiseks, mille tagajärjel võivad hakata kuhjuma kahjulikud mutatsioonid (Bai, Liu & Wang, 2023; Card *et al*., 2024). Need sündmused võivad omakorda viia populatsiooni väljasuremiseni, mis võib pikemas perspektiivis tähendada liigi kui ökosüsteemi ühe funktsionaalse osa kaotamist. Seepärast on oluline süstemaatiliselt uurida ja vajadusel teadlikult säilitada loomapopulatsioonide geneetilist mitmekesisust ja geenisiiret populatsioonide sees ja vahel. Seehulgas väärib erilist tähelepanu huntide (*Canis lupus, L.* 1758) populatsioonigeneetika, sest liik täidab ökosüsteemis olulist rolli tippkiskjana, kelle olemasolu süsteemis on otseselt seotud ökosüsteemide bioloogilise mitmekesisuse püsimisega (Ripple *et al*., 2014; Di Bernardi *et al*., 2023). Huntide populatsioonigeneetika uurimine on seega kriitilise tähtsusega looduskaitse ja elurikkuse hoidmise seisukohalt.

Väga tihti piiravad loomade geenivoolu populatsioonide fragmenteerumine ja puuduvad või katkenud ühendusteed elupaikade vahel (Schlaepfer *et al*., 2018). Hallhundi puhul on tegemist aga väga kohanemisvõimelise liigiga, kes suudab asustada erinevaid elupaiku pea igal pool Põhja-poolkeral (Ripple *et al*., 2014) ja samuti ühe pikimaid rändeid sooritava maismaa kiskjaga (Pilot *et al*., 2006). Hundi suurimaks ohuks on inimeste negatiivne suhtumine temasse ja sellest tulenevad mõjud nagu intensiivne küttimine ja lausaline hävitamine, mida on läbi ajaloo hundi puhul palju tehtud (Chapron *et al*., 2014). Geneetiliste uuringute abil on tõestatud, et üleküttimine võib hundipopulatsioonide geneetilist mitmekesisust vähendada (Rutledge *et al*. 2010; Žunna *et al*., 2023) ja halvemal juhul viia ka sagedasti esineva inbriidingu tagajärjel huntide tervise halvenemiseni (Liberg *et al.,* 2005; vonHoldt *et al*., 2008; Ražen *et al*., 2022). Seega on äärmiselt oluline jälgida nende hundipopulatsioonide geneetilist seisundit, mis on endiselt tugeva jahisurve all. Igal aastal kütitakse Eesti asurkonnas kogu populatsioonist üle 30% (Veeroja *et al*., 2024). See on üks Euroopa kõrgeima jahisurvega hundipopulatsioone (Hindrikson *et al*., 2016; Boitani *et al*., 2022).

Eesti hundipopulatsiooni populatsioonigeneetiline analüüs on vajalik, et mõista asurkonna geneetilist seisundit, struktuuri, hädavajalikku seotust naaberriikide asurkondadega. Geneetilise mitmekesisuse muutused tuleb dokumenteerida, et võimaldada võrdlust tulevaste uuringutega. Eestis on juba paarkümmend aastat uuritud Terioloogia õppetooli ja Keskkonnaagentuuri koostöös hundiasurkonna populatsioonigeneetikat, kasutades koeproove, mis on kogutud vahemikes 2004-2009 (Hindrikson *et al*., 2013) ja 2011-2015 (Plumer *et al*., 2016). Käesolevas magistritöös on kasutusel koe- ja väljaheiteproovid, mis on kogutud viimase kümne aasta jooksul (2014-2024). Seega on see uuring oluline jätk Eesti huntide populatsioonigeneetika uurimiseks, et ka edaspidi oleks tulemuste võrdlemine võimalik, arvestades seda, et jahisurve asurkonnale püsib ilmselt ka lähitulevikus. Lisaks on viimasel paaril aastal toimunud muutuseid ka populatsiooni piiravate füüsiliste barjääride osas – varem oli geenisiire füüsiliselt võimalik nii Läti kui Venemaa poolt (Plumer *et al*., 2016), kuid viimastel aastatel on kogu Baltikumis, kaasaarvatud Eestis ehitatud piirialadele Venemaaga piiriaedu ning sellel võib olla oluline mõju huntide liikumisele riigipiiride ületamisel. See võib mõjutada huntide seniseid liikumistrajektoore ja populatsiooni geneetilist mitmekesisust läbi migratsiooni vähenemise. On oluline, et viidaks läbi geneetiline uuring enne piiriaedade täielikku valmimist ja seda käesoleva töö valimi proovid ka võimaldavad. Töö jaoks koguti geneetilist materjali ka illustreerimaks kas ja kui suur võiks olla Eesti huntide seos kõrvalasuva Vene Föderatsiooni huntide asurkonnaga ning kuna proove Venemaalt võrdluseks ei saa, siis alternatiivina võrdleme piirialal korjatud geneetilist materjali ülejäänud Eestist pärit proovidega.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on analüüsida hundipopulatsiooni geneetilist mitmekesisust, populatsiooni struktuuri ja selles toimuvat geenisiiret. Lisaks vaatlusandmete põhjal kaudselt hinnata huntide piiriülest liikumist.

Töös püstitatud hüpoteesid on:

1) Eesti hundipopulatsioon on mitmekesine ja heterosügootsus on jätkuvalt kõrge;

2) Kagu-Eestis toimub Venemaalt Eestisse geenisiire;

3) populatsioonis leidub vähemalt mõni migrant.

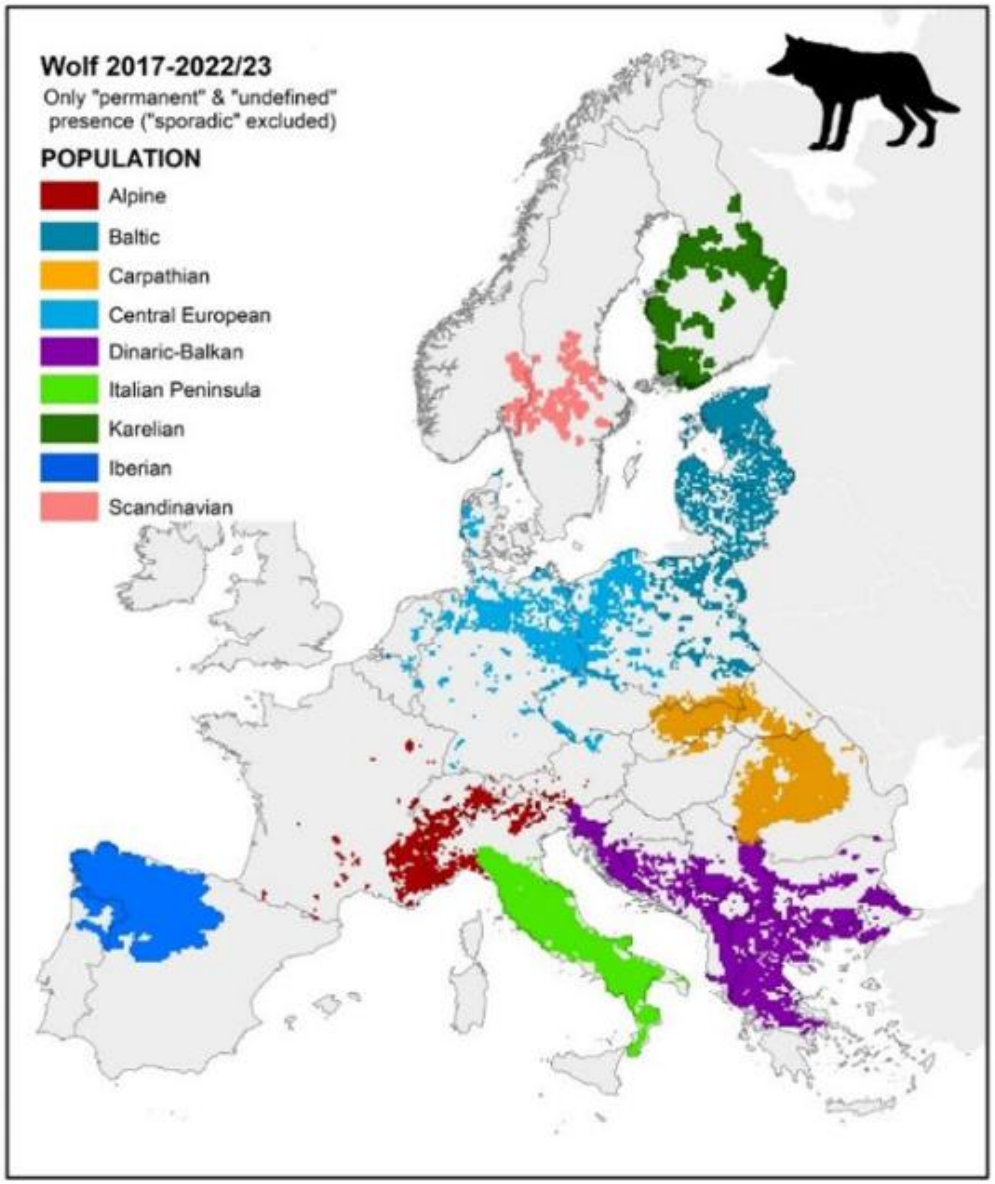
1. Ülevaade Euroopa hundipopulatsioonidest ja nende uurimisest

1.1 Huntide populatsioonigeneetika Euroopas ja Balti populatsiooni naaberpopulatsioonides

Euroopas on umbes 23 000 hunti, kes jagunevad kümne eri populatsiooni vahel (Joonis 1) ning enamikes populatsioonides hundi arvukus tõuseb ning levila laieneb (eriti Alpi, Kesk-Euroopa Lauskmaa ja Karjala populatsioonides).

2016. aastal metaanalüüsiti Euroopa hundipopulatsioonide geneetilist mitmekesisust ja arutleti uurimistulemuste üle, mis olid saadud erinevaid geneetilisi markereid (ema-, isaliini ja mõlemalt vanemalt päranduvad markerid) kasutades ning selle uuringu tulemusel oli näha, et geneetiliselt kõrgeima mitmekesisusega on Kirde-Euroopa hundipopulatsioonid (vaadeldav heterosügootsus (H_o) oli $0{,}606 \pm 0{,}095$) ja madalaimaga Edela-Euroopa populatsioonid (H_o=$0{,}526 \pm 0{,}018$) (Hindrikson *et al*., 2016). Samuti leiti, et hundipopulatsioonid suudavad geneetiliselt üksteist mõjutada (läbi migreeruvate isendite) kuni 800 km kauguseni.

Inimeste tolerantsus hundi suhtes on sageli väga madal, eriti piirkondades, kus hundid naasevad pärast pikka perioodi. Koduloomade (peamiselt lambad ja koerad) murdmine toob kaasa palju konflikte, kuid suurimaks ohuks Euroopas on hundipopulatsioonidele inimese põhjustatud suremus, mis tuleneb nii legaalsest küttimisest kui ka salaküttimisest, mis on oluline hundipopulatsioonide populatsioonigeneetika kujundaja (Chapron *et al*., 2014; Di Bernardi *et al*., 2025).



Joonis 1. Euroopa hundipopulatsioonid 2017-2022/2023. Kaart võetud: Boitani *et al*., 2022.

Balti populatsiooni kuuluvad Eesti, Läti, Leedu ja Kirde-Poola hundid ning see moodustab suure Venemaa Euroopa-osa hundipopulatsiooni edelaservast ning selle suuruseks loetakse umbes 900-1400 isendit (Boitani *et al*., 2022). Populatsioon oli 1970ndatel ja 1980ndatel üleküttimise tõttu väljasuremise äärel (Jędrzejewski *et al*., 2005; Baltrūnaitė, Balčiauskas & Åkesson, 2013), läbides tugeva pudelikaela (Hindrikson *et al*., 2013; Plumer *et al*., 2016), kuid vaatamata sellele on populatsioon pärast arvukuse tõusu teiste Euroopa hundipopulatsioonidega võrreldes kõrge geneetilise mitmekesisusega (Jędrzejewski *et al*., 2005; Baltrūnaitė *et al*., 2013; Czarnomska *et al*., 2013; Hindrikson *et al*., 2013; Plumer *et al*., 2016; Žunna *et al*., 2023).

Venemaa hundipopulatsiooni kõige värskem hinnang aastatel 2011–2015 on umbes 40 000 isendit (Poyarkov *et al*., 2022). Suure arvu põhjuseks on nii huntide ökoloogiline plastilisus kui ka suhteliselt madal küttimissurve (Kolesnikov *et al*., 2016). Venemaal hundiarvukuse dünaamika on väga tugevalt olnud seotud Venemaa ajalooga: pärast I Maailmasõda ja Venemaa kodusõda (1917–1923), hundipopulatsioon suurenes hüppeliselt, kuid huntide suur küttimissurve langetas populatsiooni arvukuse 20. sajandi teiseks pooleks (Poyarkov *et al*., 2022). 1990ndatel, pärast Nõukogude Liidu lagunemist, populatsiooni ohjamine lõppes ning huntide arvukus tõusis taas hüppeliselt (Bragina *et al*., 2015).

Skandinaavia hundipopulatsiooni kuulub umbes 460 hunti Norra ja Rootsi riigi aladelt. Arvuliselt kasvav populatsioon asustab praegu Kesk-Rootsit ja allpool Lõuna-Norrat (Boitani *et al*., 2022). Sarnaselt Balti populatsioonile oli ka Skandinaavia asurkond umbes 50-60 aastat tagasi väljasuremise äärel, kuid taastus läbi geenisiirde Soome poolt (Wabakken *et al*., 2001; Vilà *et al*., 2003a; Åkesson *et al*., 2022). Populatsioonis toimus oluline huntide elujõulisuse nõrgenemine, mis tulenes sagedase inbriidingu tagajärgedest (Liberg *et al*., 2005). Asurkond tuli sellest välja tänu neljale kuni kuuele naaberpopulatsioonidest sisse rännanud hundile (Vilà *et al*., 2003a; Åkesson *et al*., 2016, 2022). Seega inbriiding ja väikese määraga geenisiire on olnud Skandinaavias tugevaks ohuks hundipopulatsiooni geneetilisele seisundile (Åkesson *et al*., 2016, 2022).

Karjala huntide asurkond hõlmab hunte Soomest ja Venemaalt ja asub Skandinaavia populatsioonist idas. Asurkonda kuulub üle kahesaja hundi (Boitani *et al*., 2022). Soome Karjala hundipopulatsioonis on täheldatud selgeid geneetilise pudelikaela efekti tunnuseid, mis on seotud populatsiooni arvukuse vähenemise ja piiratud geenivooluga Venemaa-poolsest Karjala populatsiooni osast (Aspi *et al.*, 2006, 2009; Jansson *et al*., 2012, 2014). 2006. aastaks oli populatsioonis toimunud tugev heterosügootsuse langus ja inbriidingu kasv (Jansson *et. al,* 2012). Mikrosatelliitanalüüside tulemusel leiti, et ligi 20% ajaloolistest varem täheldatud mikrosatelliitalleelidest enam ei tuvastatud (Jansson *et al.*, 2014).

Euroopa kõige värskem hundipopulatsiooni piirneb Balti hundipopulatsiooniga lõunast ja selleks on Kesk-Euroopa lauskmaa populatsioon (Szewczyk *et al*., 2019), mis praeguseks hetkeks on laienenud Poolast ja Saksamaalt Hollandi, Taani, Belgia, Luksemburgi, Austria ja Tšehhini (Szewczyk *et al*., 2019; Boitani *et al*., 2022). Kuigi selle geneetiline mitmekesisus on pudelikaela efekti ja ida-läänesuunalise rändebarjääride geenisiirde tõttu madalam kui Balti

populatsioonis, on populatsiooni-sisene geenisiire suur, sest puudub tugev alagruppideks jaotumine (Szewczyk *et al*., 2019).

1.2 Eesti huntide populatsioonigeneetika

Esimeses Eesti huntide populatsioonigeneetikat käsitlevas uuringus kasutati 116 Eestist ja 50 Lätist pärit huntide koeproovi aastatest 2004-2009 ning mikrosatelliitmarkeritel (n=16) põhinev analüüs näitas, et see hundipopulatsioon on geneetiliselt mitmekesine ning oodatav (H_e) ja vaadeldav heterosügootsus (H_o) olid kõrged: vastavalt 0,73 ja 0,75, kirjeldades mitmekesist ja tervislikku geneetilist varieeruvust (Hindrikson *et al*., 2013). Samuti leiti, et tõenäoliselt läbis Eesti-Läti hundipopulatsioon 1960ndatel nn pudelikaela – kahe riigi peale loendati aastatel 1966-1970 vaid 22 hunti (Hindrikson e*t al*., 2013). Populatsiooni struktuuri analüüsidest selgus, et analüüsitavad hundid moodustavad geneetiliselt neli omavahel eristuvat alamgruppi. See oli ootamatu tulemus nii väikse geograafilise ala kohta, kuid oli hästi selgitatav intensiivse jahisurve ja sellest tuleneva suure immigratsioonimääraga (Hindrikson *et al*., 2013). Võrdluseks toodi Soome, kui geograafiliselt suurem ala, kus sellist populatsiooni geneetilist eristumist pole täheldatud (Aspi *et al*., 2006; Jansson *et al*., 2012). Soome hundipopulatsiooni ei mõjutanud nii tugev jahisurve kui Eesti populatsiooni sel ajal – iga-aastaselt kütiti Soomes umbes 6-10% populatsioonist (Aspi *et al*., 2006), samas Eestis on olnud hinnanguliselt jahisurveks aastaid 30-50% populatsioonist (Hindrikson *et al*., 2013; Veeroja *et al*., 2024). Nelja alamgrupi analüüsides oli näha, et üks alamgruppidest oli geneetiline grupp, mis pärines pudelikaela-eelsest ajast ja ülejäänud alamgrupid olid tõenäoliselt tekkinud hiljem sisserännanud loomadest. Selline nähtus oli võimalik tugeva jahisurve tõttu, mis tekitas võimaluse ümberkaudsete alade huntidel Eesti ja Läti aladele immigreeruda (Hindrikson *et al*., 2013).

2016. aastal läbiviidud uuring Eesti hundipopulatsioonigeneetikast, mis muuhulgas keskendus suursaari (Saaremaa ja Hiiumaa) taasasustavatele huntidele, kasutas valimina 168 Eesti hundi koeproovi aastatest 2011-2015 ja mikrosatelliitmarkeritel (n=15) põhinev analüüs kinnitas, et oodatav heterosügootsus (H_e) oli 0,67 ja vaadeldav heterosügootsus (H_o) 0,66 (Plumer *et al.,* 2016). Geneetilise struktuuri analüüsist selgus, et populatsioon jaguneb endiselt neljaks alamgrupiks, kuid seekord kattusid need geograafiliselt rohkem kui 2013. a uuringu tulemuses (Hindrikson *et al*., 2013; Plumer *et al*., 2016). Enamik Eesti hundipopulatsiooni oli geneetiliselt

heterogeenne, välja arvatud üks homogeensem ala Saaremaal ja Lääne-Eestis. Analüüsi tulemusena saadud heterosügootsuse määr oli sarnane paljudele teistele hundi asurkondadele Euroopas nagu näiteks Soome, Poola ja Bulgaaria asurkonnad (Plumer *et al.*, 2016). Uuringus juhiti tähelepanu ka 2013. aasta artiklile ja kinnitati, et mõlemate analüüside tulemuste vahel on märgatavad erinevused. Näiteks oli geneetiliselt erinevate huntide kokkupuuteala nihkunud rohkem ida poole. Tähelepanu pöörati ka sellele, et uuringud polnud analüüside poolest üks ühele võrreldavad, kuid uuringuid võrreldes sai siiski väita, et Eesti huntide populatsioonigeneetika on aja jooksul muutunud. Füüsilised liikumistõkked ei olnud suure tõenäosusega oluliseks populatsioonigeneetikat kujundavaks teguriks – otseseid aastaringseid tõkkeid riikide piiril nii Läti kui Venemaa suunal ei eksisteerinud (Plumer *et al.*, 2016).

2. Populatsioonigeneetikat mõjutavad tegurid

Populatsioonide geneetilist struktuuri võivad mõjutada mitmed tegurid, millel on mõju populatsiooni arvukusele ja levikuvõimele. Sellisteks teguriteks, mis on tugevalt mõjutanud Eesti huntide populatsiooni geneetilist struktuuri ja dünaamikat, peetakse peamiselt tugevat jahisurvet ja immigratsiooni naaberpopulatsioonidest (Hindrikson *et al*., 2013; Plumer *et al.*, 2016).

2.1 Jahisurve

Huntide küttimine saab huntide populatsioonigeneetikat mõjutada läbi populatsiooni killustumise, geneetilise triivi vähenemise, eelnevate tagajärjel inbriidingu põhjustamise ja huntide ja koerte hübridiseerumise riski suurendamise läbi (Kaczensky *et al*., 2013; Jansson *et al*., 2014; Chapron & Treves, 2016; Plumer *et al.*, 2016).

Huntide intensiivne küttimine on varasemalt vähendanud Euroopa hundipopulatsioonide arvukust ja ruumilist esinemissagedust, mis vähenenud geenivoolu tõttu võib tekitada inbriidingut ja heterosügootsuse määra tugevat langust (Liberg *et al.*, 2005). Skandinaavia hundipopulatsiooni puudutavas uuringus päästsid naaberpopulatsioonist immigreerunud neli kuni kuus hunti esimese populatsiooni geneetilisest vaesumisest (Liberg *et al.*, 2005; Åkesson *et al*., 2022).

On näidatud, et koerte ja huntide hübridiseerumise risk tõuseb eriti aladel, kus huntide suremus inimmõju tagajärjel on kõrge (Andersone *et al*., 2002; Vilà *et al.*, 2003; Godinho *et al.*, 2011; Hindrikson *et al*., 2012; Leonard *et al*., 2014) ja lõhutakse huntide karjasisene struktuur (Valdmann *et al.*, 2004; Jędrzejewski *et al.*, 2005). Samuti on leitud, et inimtegevusest põhjustatud suremus vähendab väljakujunenud populatsioonide levimist ning seal, kus inimtegevus on madal, on huntide levimus kõrgem (Jimenez *et al.*, 2017). See võib tulla ka sellest, et küttimine vähendab üksikisendite hajumist ja seda peamiselt just palju liikuvate noorloomade arvelt. Samas hajumine võib igal juhul olla hundipopulatsioonis alahinnatud, kuna salakütitud loomad jäävad tõenäoliselt märkamata.

2.2 Füüsilised tõkked ja piiriaiad

Inimeste poolt rajatud ja pidevalt uuendatav infrastruktuur mõjutab praegu ja ka edaspidi oluliselt loomade liikumisteid, geograafilist paiknemist (Muhly *et al*., 2019; Zanni *et al*., 2023) ja seeläbi ka liikide ja populatsioonide geneetilisi näitajaid (Papp *et al*., 2022). Hetkel võivad Eestis sellisteks huntide liikumist mõjutavateks struktuurideks kujuneda Rail Balticu konstruktsioonid, uued kiirteed ja Eesti-Vene piirile ehitatud piiriaiad (Hindrikson *et al*., 2013; Plumer *et al*., 2016; Boitani *et al*., 2022).

Füüsilised tõkked võivad eriti mõjutada väiksemate populatsioonide geneetilist seisundit (Hindrikson *et al*., 2013; Žunna *et al*., 2023), sest väikesed populatsioonid on oma suuruse tõttu kergemini mõjutatud populatsiooni struktuuri muutustest ning Eesti hundiasurkonna puhul tuleb arvestada, et tüüpilisel huntide jooksuajal ning ka hilisemal hajumise ajal on Peipsi järv ilma jääta ning võib seetõttu olla oluliseks migratsioonibarjääriks.

3. Materjal ja meetodid

3.1 Proovid

Töö analüüsi alustati 506 koeprooviga, mis on kogutud viimase üheksa aasta (2014-2022) vältel ja olid saadud Keskkonnaagentuurist. Hiljem lisandus eraisikute vahendusel veel kaks koeproovi. Keskkonnaagentuuri proovid on kogutud legaalselt kütitud huntidelt, eraisikutelt saadud proovide päritolu ei ole kindel. Proovide hulk on piisav Eesti hundipopulatsioonigeneetika uurimiseks, sest proovid on kogutud peamiselt legaalse jahi käigus lastud huntidelt, mis moodustab Eesti hundipopulatsioonist märkimisväärse osa. Keskkonnaagenturist saadud koeproove kasutati eelmisel aastal Kirke Raidmetsa kaitstud magistritöös (Raidmets, 2023), mis uuris hundi ja koera hübridiseerumise määra Eesti hundipopulatsioonis sama ajaperioodi jooksul ehk 2014-2022. Selgus, et hundiproovidest kaheksa olid hübriidsed isendid (Raidmets, 2023) ning käesoleva töö valimist jäeti need proovid välja, kuna magistritöö eesmärgiks ei ole määrata hübridiseerumist, vaid populatsioonigeneetikat. Lisaks eemaldati valimist analüüsi käigus 18 koeproovi, millest amplifitseeriud lookused andsid suurel määral loetamatuid või ebaselgeid tulemusi.

Lisaks koeproovidele kogus Tartu Ülikooli Terioloogia töörühm 2023-2024 väljaheiteproove Eesti-Venemaa piirilt Saatse aladelt. Lisaks küsisime andmeid ka Mustvee kordonilt ning Piusa kordonilt, kuid nendelt kordonitelt laekunud vaatluste arv oli märkimisväärselt väiksem Saatse kordonist saadud andmetest. Kokku koguti 54 esmasel vaatlusel hundiväljaheiteks määratud proovi, millest 37 osutus pärast DNA-sekveneerimist hundi väljaheiteproovideks. Mitte huntideks osutunud proovide seas oli 11 rebast, kaks koera, üks kährik ja neli järjestust, millele konkreetset vastet ei leitud. Lisaks eemaldati andmeanalüüsi käigus 1 hundiproov, millest amplifitseeritud lookused olid loetamatud. Kuna väljaheiteproovid koguti Saatse piirkonnast, kus oli tõenäoline sama isendi mitme ekskremendiproovi kogumine, võrreldi kõikide proovide geneetilisi andmeid ning seejärel eemaldati tulemuste põhjal valimist 9 samadelt isenditelt pärit proovi.

Kuna käesoleva töö üheks eesmärgiks oli ka tuvastada, kas Venemaalt üle piiri Eesti-Vene liikuvate huntidega toimub geenisiiret, otsustati koguda väljaheite proove Eesti-Vene piiri äärest, kus vaatluste põhjal toimus huntide liikumist üle piiri (selle kohta lähemalt peatükis 3.2 Vaatlusandmed huntide liikumisest Eesti-Vene piiril). Proovid koguti nummerdatud kilekottidesse ning leiukoht dokumenteeriti kirjalikult, pannes kirja proovi number, oletatav

liik, leiukoha koordinaadid ja kogumise kuupäev ning väljaheite seisukord (uus, vana, lagunenud). Kõik proovid külmutati ja talletati töörühma ruumides -80°C külmas, et tagada DNA säilimine.

3.2 Vaatlusandmed huntide liikumisest Eesti-Vene piiril

Vaatlusandmed on kogutud aastatel 2022 – 2024 koostöös Politsei- ja Piirivalveametiga (PPA). Saatse, Mustvee ja Piusa kordoni töötajatega koguti huntide liikumisinformatsiooni, et illustreerida käesolevas magistritöös läbi viidud Eesti huntide populatsioonigeneetika analüüsi tulemusi. Vaatluse aluseks olid nähtud loomad, hundijäljed või PPA piirikaamerate salvestused. Töörühmale edastati iga vaatluse kohta iganädalaselt andmeid järgneval kujul: kuupäev, kellaaeg, koordinaadid, isendite kogus, isendite kirjeldus ja/või tegevus ja isendite liikumise suund. Seda, kas isendid ületasid riigipiiri või mitte otsustati vaatluse kirjelduse põhjal. Piiri ületus oli kindel, kui isendeid vaadeldi otseselt piiri ületamas või jäljeraja suunda üle piiri kulgevat. Mitte kindlaks piiriületuseks loeti vaatlused, kus hundid liikusid lihtsalt piiri lähedal, kuid nende jäljerada või isend ise piiri ei ületanud.

Selleks, et koguda lisaks väljaheiteproove, arvestati välitööde planeerimisel kogutud hundi vaatlusandmetega ning vesteldi piirivalvurite ja kohalike jahimeestega, kes teadsid kirjeldada hundi kõige sagedasemaid tegevuspaiku. Lähtuvalt sellest sai töörühm välitöödel läbida hundi poolt enim kasutusel olnud elupaiku, et leida vajalikke väljaheiteproove.

3.3 Väljaheiteproovide ettevalmistamine

Väljaheiteproovidest DNA eraldamiseks võeti ekskremendid umbes 24 tunniks toatemperatuurile sulama. Sellele järgnevalt tegutseti töörühma poolt väljatöötatud laboriprotokolli järgi:

1) ekskremendist võeti 10 grammi materjali, mida kasutati edasiseks töötlemiseks. See jaotati 4 grammiste homogeniseeritud tükkidena kahte plastikust topsi, millele lisati 40 ml milli-Q vett,
2) segu segati plastikust pulgaga 30 minutit, mille järel valati segu läbi 0,5 mm sõela 50 ml tuubi. Plastiktopsi seinad loputati destilleeritud veega ja kallati tuubi, saades lõppruumalaks 50 ml,

3) tuubi tsentrifuugiti 1550g juures 5 minutit ning sellest protsessist eraldunud vedelik valati ära. Lõpptulemusena oli igast väljaheiteproovist edasisteks toiminguteks olemas kaks tuubi: (1) esimene neist oli mõeldud geneetilise analüüsi jaoks ja (2) teine töörühmale käesoleva magistritööga mitteseonduvate parasiidiuuringute jaoks.

3.4 DNA eraldamine, sekveneerimine ja liigi tuvastamine

Keskkonnaagentuurist saadud koeproovid olid juba varasemalt eraldatud eelmisel aastal kaitstud magistritöö raames (Raidmets, 2023). Seega, selle magistritöö raames eraldati DNA vaid kahest (eraisikutelt saadud) koeproovist ja kõikidest piirialalt kogutud väljaheiteproovidest. Kahest koeproovist DNA eraldamine toimus vastavalt Qiagen MagAttract HMW DNA Kit'i protokollile. Koeproovid olid juba varasemalt liigini kinnitatud, kuid kogutud väljaheiteproovidel tuli liik sekveneerimise abil enne analüüsi kaasamist kinnitada.

Väljaheidetest DNA eraldamiseks kasutati NucleoSpin DNA Stool Kit'i (Macherey-Nagel, Saksamaa). Tootjaprotokollis tehti üksikuid muudatusi: proove kuumutati 98°C juures 7 minutit parasiidimunade efektiivsemaks lõhkumiseks; proove sadestati 2°C juures 10 minutit, et jääkprodukti paremini sadestada.

Praimerite Canis7F (CCCTATGTACGTCGTGCATTA) ja Canis3R (TGTGTGATCATGGGCTGATT) abil PCR-amplifitseeriti ja sekveneeriti eraldatud DNA-st mitkondriaalse mtDNA kontrollregiooni fragment, mis andis PCR-produkti pikkusega 361 aluspaari. Analüüsiks kasutati 20 µl reaktsioonisegu, mis sisaldas 1 µl puhastatud DNA-d, 1 µl praimerisegu (lõppkontsentratsiooniga 0,25 µM) ja 4 µl 5x HOT FIREPol MultiPlex Mix'i (Solis BioDyne, Tartu, Eesti). Analüüsiks kasutatud reaktsioonisegu (kokku 20 µl) sisaldas: 1 µl puhastatud DNA-d, 1 µl praimereid (lõppkontsentratsiooniga 0,25 µM), 4 µl 5x HOT FIREPol MultiPlex Mix'i (Solis BioDyne, Tartu, Eesti) ja 14 µl destilleeritud vett. PCR-i masinas kasutatava programmi tingimused on esitatud tabelis 1.

Tabel 1. PCR-i läbiviivasse masinasse sisestatavad tingimused DNA amplifitseerimise läbiviimiseks.

95°C	12 min	
95°C	20 s	
55°C	30 s	(-0,5°C iga tsükli kohta)
72°C	45 s	
98°C	20 s	
50°C	30 s	
72°C	45 s	35 tsüklit
72°C	2 min	

Saadud PCR-produktid puhastati ensüümidega FastAP ja ExoI (Thermo Fisher Scientific), mõlemat lisati 1 ühik.

Pärast puhastamist saadeti PCR-produktid Tartu Ülikooli Genoomika Instituuti Genoomika tuumiklaborisse sekveneerimiseks. Saadud DNA järjestused sisestati programmi Nucleotide BLAST (National Library of Medicine, USA), mis aitas tuvastada ekskremendi väljutanud looma liigi võrreldes sisestatud järjestust geneetilises andmebaasis olevate suurima homoloogiaga järjestustega.

3.5 Mikrosatelliitmarkerite analüüs

Kui nii koe- kui väljaheiteproovidel oli DNA eraldatud ja väljaheiteproovide puhul ka sekveneerimise abil kindlaks tehtud, et tegu on hundiproovidega, sai edasi liikuda mikrosatelliitmarkerite analüüsi juurde. Canine Genotypes Panel 1.1 Kit'i abil analüüsiti kõikidel proovidel 19 mikrosatelliitlookust: AHTk211, CXX279, REN169O18, INU055, REN54P11, INRA21, AHT137, REN169D01, AHTh260, AHTk253, INU005, INU030, FH2848, AHT121, FH2054, REN162C04, AHTh171, REN247M23 ja Amelogeniin (Finnzymes, Canine Genotype Panel 1.1). Amelogeniini marker oli vajalik soo määramiseks ja edasisteks analüüsideks see eemaldati.

Mikrosatelliitmarkerite analüüs toimus vastavalt Canine Genotypes Panel 1.1 Kit juhendile (Finnzymes, Canine Genotype Panel 1.1), kuid mõningate muudatustega: multipleksi

amplifitseerimisreaktsioon viidi läbi 10 µl segus, millest 9 µl oli reaktsioonisegu ja 1 µl genoomne hundi DNA; reaktsioonisegu sisaldas 4,5 µl Canine Genotypes Master Mix'i ja 4,5 µl Canine Genotypes Primer Mix'i. Iga koeprooviga viidi reaktsioon läbi üks kord, sest koest eraldatud proovis olev DNA kogus on piisav, et saada edukalt defineeritavad alleelipikkused. Enamasti on väjaheiteproovide puhul tulemused palju kehvemini tõlgendatavad, sest proovi aeg keskkonnas on teadmata. Et vähendada alleelipikkuste valesti tõlgendamist, korrati väljaheiteproovide puhul reaktsiooni iga prooviga kuus korda.

PCR reaktsioon viidi läbi masinatel Eppendorf Mastercycler® Pro S ja Biometra® T-professional. Multipleksreaktsiooni tingimused on esitatud tabelis 2.

Tabel 2. PCR-i läbiviivasse masinasse sisestatavad tingimused DNA amplifitseerimise läbiviimiseks.

95°C	20 min				
94°C	30 s				
58°C	45 s	(-0,5°C iga tsükli kohta)			
72°C	1 min	2	11	(12 tsüklit)	
94°C	30 s				
52°C	45 s				Kokku 30 tsüklit
72°C	1 min	5	17	(18 tsüklit)	
72°C	7 min				
4°C	paus				

Pärast PCR läbiviimist saadeti proovid Tartu Ülikooli Genoomika Instituudi Genoomika tuumiklaborisse sekveneerimisele, kus iga proov segati kokku järgmise protokolli järgi: 0,5uL DNA, 9,2 µl HIDI formamiidi, 0,3 µl GeneScanTM 500 LIZ Size Standard pikkusmarkerit (Applied Biosystems) ja seejärel analüüsiti ABI PRISM 3100 kapillaarsekvenaatoril.

3.6 Andmeanalüüs

Alleelipikkuste lugemiseks kasutati tarkvara Peak Scanner (Applied Biosystems, 2006), null-alleelide ja genotüpeerimisvigade leidmiseks kontrolliti tulemusi tarkvaraga Micro-Checker (Van Oosterhout *et al*., 2004). Pärast seda viidi saadud andmetega läbi statistiline analüüs mitmete programmidega. Huntide populatsiooni geneetilist klasterdumist analüüsiti

programmiga Structure (versioon 2.3.4, Pritchard *et al*., 2012). Markovi ahela Monte Carlo (MCMC) simulatsiooni korrati 500 000 korda, algfaasi (*Burnin Period*) pikkuseks seati 50 000. Programmi Structure jooksutati esmalt kõikide proovidega. Saadud klastritest suurema võimalikku jaotumist alamklastritesse kontrolliti eraldi klasteranalüüsiga, kuhu kaasati ainult suuremasse klastrisse kuulunud proovid. Kõikide eelnevate klasteranalüüside puhul varieeriti klastrite arvu (K) 1-10 ja iga K väärtuse korral korrati simulatsiooni 10 korda. Programmiga Genetix (versioon 4.05.2, Belkhir *et al*., 2004) arvutati valimi oodatav (H_e) ja vaadeldav (H_o) heterosügootsus, erinevate gruppide eristumise määr (F_{ST}) ja alleelide mitmekesisus (A_R). Valimi klasterdumist uuriti analüüsiga ka kahe ajaperioodi kaupa: 2014-2018 ja 2019-2024. Kaheks jaotamise põhjuseks oli keskmine pesakondade arv: esimesel perioodil 23,6 ja teisel perioodil tunduvalt kõrgem – 28,7 (Veeroja *et al*., 2024). Analüüsis varieeriti klastrite arvu ühest kümneni, kuid simulatsiooni korrati nende gruppidega 5 korda. Lõplik klastrite arv tehti kindlaks programmiga StructureSelector (Li *et al*., 2018). Programmiga Genetix (versioon 4.05.2, Belkhir *et al*., 2004) analüüsiti ka ajaperioodipõhiste gruppidel H_e, H_o ja A_R.

Et tulemusi võrrelda töödeldi andmeid lisaks Structure analüüsidele ka DAPC tarkvaraga (Jombart *et al*., 2010). Lisainfo saamiseks huntide omavahelise suguluse kohta analüüsisime andmeid ka programmiga MLRelate (Kalinowski *et al*., 2006). Programmi sisestati valim proovidest ja tulemusena saadi maatriks, mis kirjeldas tähistega U (*unrelated*, mitte suguluses), HS (*half siblings*, poolõed/-vennad), FS (*full siblings*, täisõed/-vennad) ja P/O (*parent*/*offspring*, vanem/järglane) kõige tõenäolisemaid suhteid valimis olevate huntide vahel. Tarkvaraga GeneClass2 (Piry *et al.*, 2004) viidi läbi migrantide tuvastamise analüüs ja programmis Genetix (versioon 4.05.2, Belkhir *et al.*, 2004) viidi läbi PCA-analüüs. Tervele valimile tehti ka Hardy-Weinbergi test Genepop v. 4.7.5 tarkvaraga (Rousset *et al*., 2008).

3.7 Autori roll

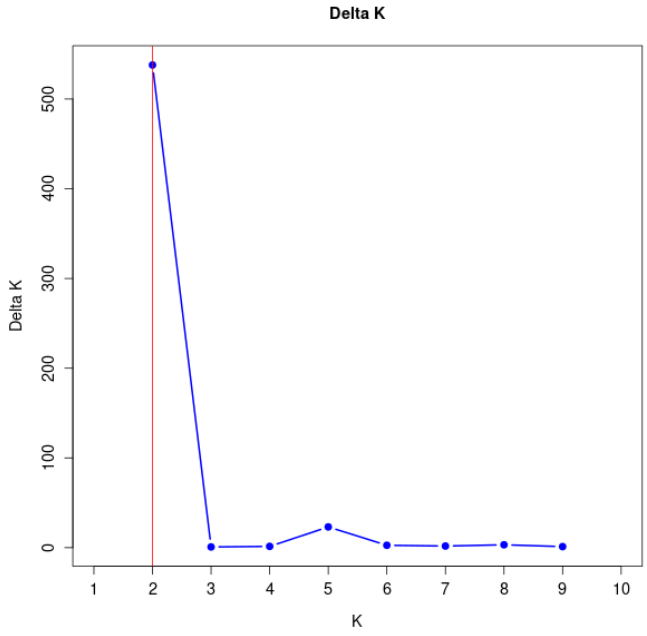
Autor osales väljaheiteproovide kogumiseks välitöödel ja viis proovidega läbi kõik järgnevad laboritöö ja andmeanalüüsi etapid (proovide ettevalmistus DNA eraldamiseks, DNA eraldamine, PCR läbiviimine, ettevalmistus sekveneerimiseks, sekveneerimistulemuste tõlgendamine ja mikrosatelliitanalüüs). Koeproovide osas kasutas autor varem eraldatud DNA-d PCR-i tegemiseks, tõlgendas fragmentanalüüsi tulemusi ja viis läbi andmeanalüüsi. Proovidest ülevaate saamiseks korrastas ja kandis autor PPA edastatud andmed tabelisse. Autor kirjutas magistritöö kõigi osade esimese käsikirja ning täiendas neid jooksvalt nii kirjanduse kui ka juhendajate soovituste põhjal.

4. Tulemused

Lõpliku valimi suuruseks oli 509 hundiproovi, millest koeproovid olid 482 ja väljaheiteproovid 27. Analüüsi kaasatud hundiproovidel esines siiski üksikuid puuduvaid alleelipikkusi ehk nullalleele - neid oli kokku 92 kõigist 18 324 kirjapandud alleelist. Populatsioon ei ole Hardy-Weinbergi tasakaalus, mis viitab sellele, et asurkonda mõjutavad kas valikusurve, geenisiire, mutatsioonid või isendite mitte vaba ristumine. Hardy-Weinbergi tasakaalust on populatsioon väljas ka siis, kui testi teha ainult koeproovidega.

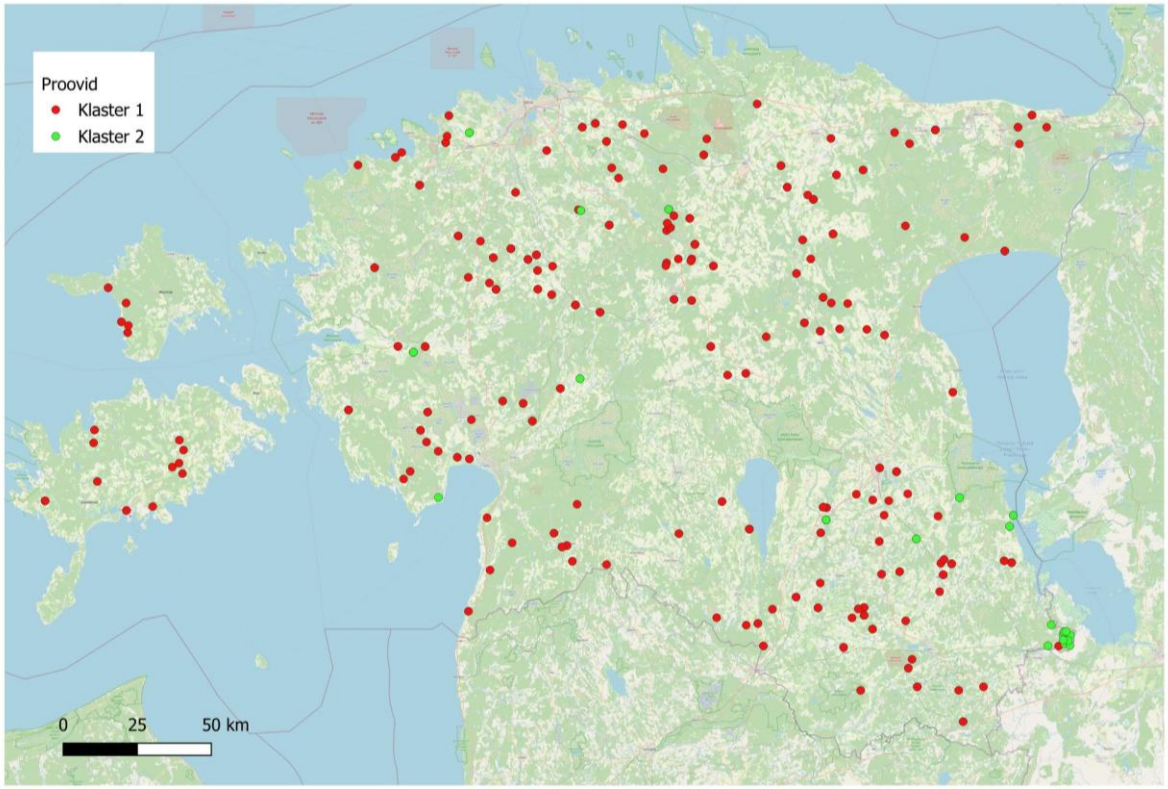
4.1 Eesti hundipopulatsiooni geneetiline struktuur ja geneetiline mitmekesisus

Kogu andmestik (n=482) jagunes mikrosatelliitmarkerite analüüsi põhjal kahte klastrisse: suuremasse klastrisse (klaster 1) kuulus 475 hunti ja väiksemasse klastrisse (klaster 2) 34 hunti (Joonised 2 ja 3). Esimene grupp paiknes ühtlaselt üle Eesti, kuid teine grupp oli rohkem paigutunud Kagu-Eestisse (Joonis 4). Teise väiksema klastri oodatav heterosügootsus (H_e) tuli 0,87, kuid vaadeldav heterosügootsus (H_o) tuli 0,54. Selline kõrge oodatav heterosügootsus võib viidata teise klastri huntide päritolule suuremast lättepopulatsioonist. Madal vaadeldav heterosügootsus võib tuleneda valimi väiksest suurusest või siis sellest, et nad on veidi rohkem isoleeritud oma lättepopulatsioonist. F_{ST} kahe klastri vahel tuli 0,08.



Joonis 2. StructureSelectoriga kindlaks tehtud optimaalne klastrite arv Eesti huntidel 2014-2024 ajavahemikus kogutud proovide põhjal (n=509).

Joonis 3. Hundipopulatsiooni jaotumine geneetiliselt kaheks klastriks (n=509). Esimesse klastrisse kuuluvad proovid on tähistatud punase värviga ja teise klastrisse kuuluvad rohelise värviga.

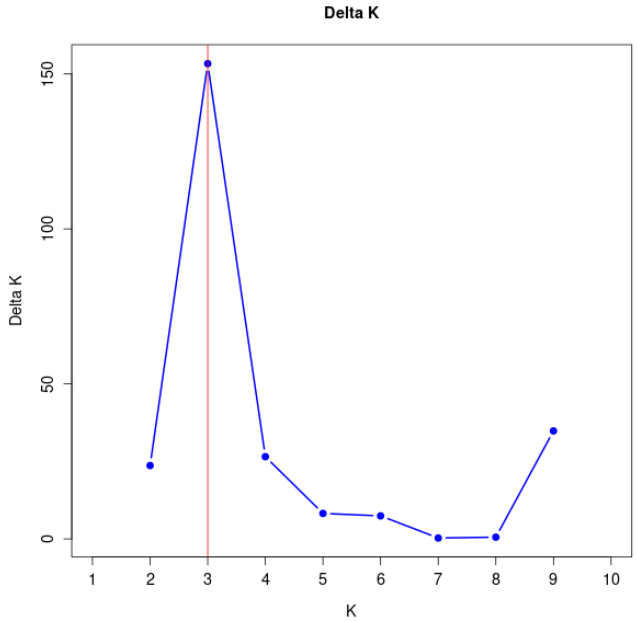


Joonis 4. 2014-2024 kogutud proovide (n=509) geograafiline jagunemine kahte klastrisse. Klaster 1 (punane) sisaldab enamust populatsiooni kuuluvaid hunte (n=475) ja Klaster 2 (roheline) väiksemat geograafiliselt rohkem eristuvat osa populatsioonist (n=34).

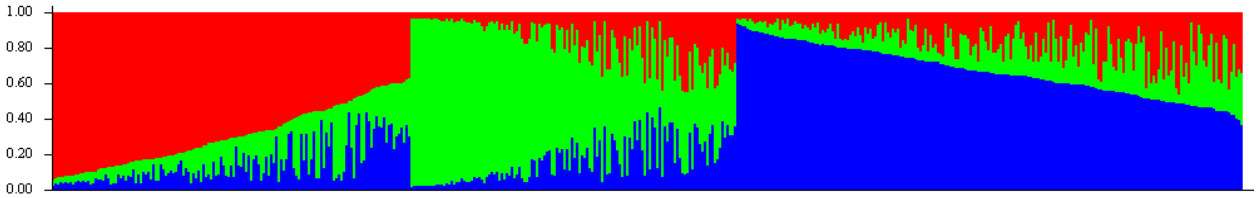
Lisaks korrati veel klasteranalüüsi, kus kasutati kõiki hundiproove, kuid eemaldati väljaheiteproovid, mis olid kogutud Eesti-Vene piiri äärest (n=12). Seda tehti selleks, et kontrollida, kas geograafiliselt samast piirkonnast kogutud proovid ei põhjusta oma tõenäoliselt suurema geneetilise sarnasuse tõttu kallutatud või eksitavaid tulemusi. Analüüsi tulemus näitas, et ka ilma väljaheiteproovideta jaotus populatsioon proovide põhjal kaheks klastriks, mis viitab sellele, et väljaheiteproovid ei mõjutanud tulemusi eksitaval viisil.

Geneetilise mitmekesisuse analüüs näitas, et Eesti hundipopulatsiooni oodatav heterosügootsus (H_e) on 0,77 ja vaadeldav heterosügootsus (H_o) on 0,65. Alleelide mitmekesisuseks (A_R) tuli 15,44 ja gruppide geneetiliste eristumise määraks (F_{ST}) 0,077.

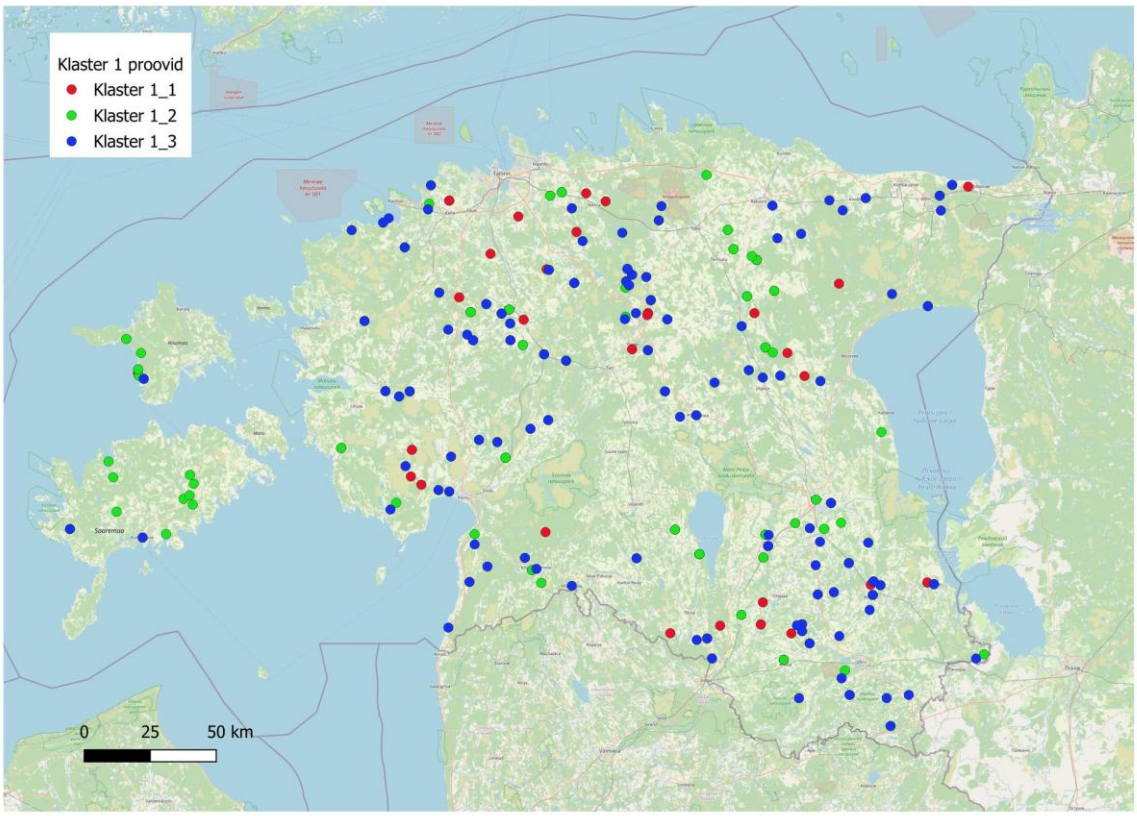
Kuna teine klaster võib esimesse klastrisse kuuluvate isendite jaotumist mõjutada, siis analüüsiti esimene klaster programmiga Structure veel eraldi, et näha, kas see jaguneb geneetiliselt veel omakorda. Analüüsi tulemus näitas, et suurem klaster jaguneb kolmeks geneetiliselt eristuvaks grupiks (Joonised 5 ja 6).



Joonis 5. StructureSelectoriga kindlaks tehtud optimaalne klastrite arv suures üldises klastris (n=475)



Joonis 6. Esimese suure klastri jaotumine omakorda kolmeks geneetiliselt eristuvaks alamklastriks (n=475).

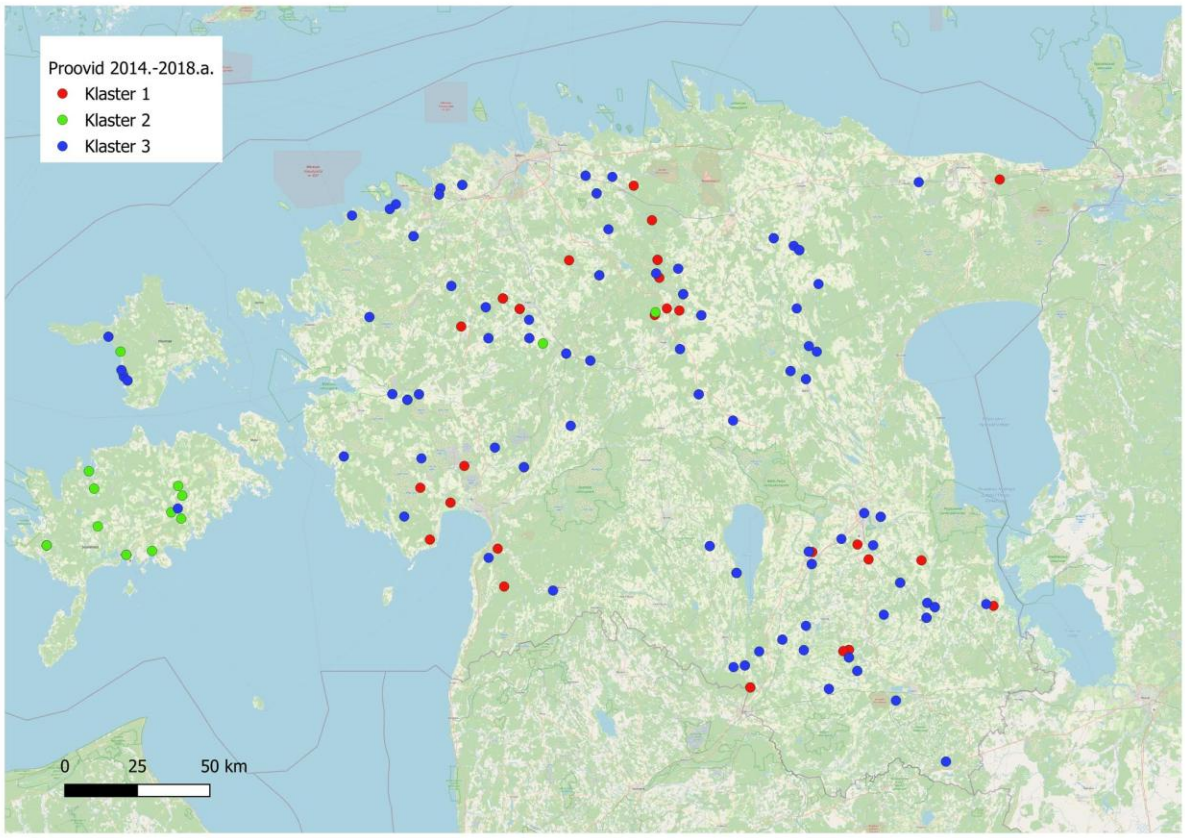


Joonis 7. Klaster 1 (n=475) jagunemine kolmeks geneetiliseks alamgrupiks. Klaster 1_1 (punane) sisaldab 143 hunti, klaster 1_2 (roheline) 125 hunti ja klaster 1_3 (sinine) sisaldab 200 hunti.

4.2 Ajaline populatsioonigeneetiline dünaamika ja statistilised näitajad

Ajaperioodi 2014-2018 proovid (n=254) jagunesid analüüsi tulemusel kolmeks klastriks (Joonis 8). Sellel ajaperioodil kogutud proovid sisaldasid ainult kütitud huntide koeproove. Selle ajaperioodi huntide H_e=0,75; H_o=0,64 ja A_R=11,8890.

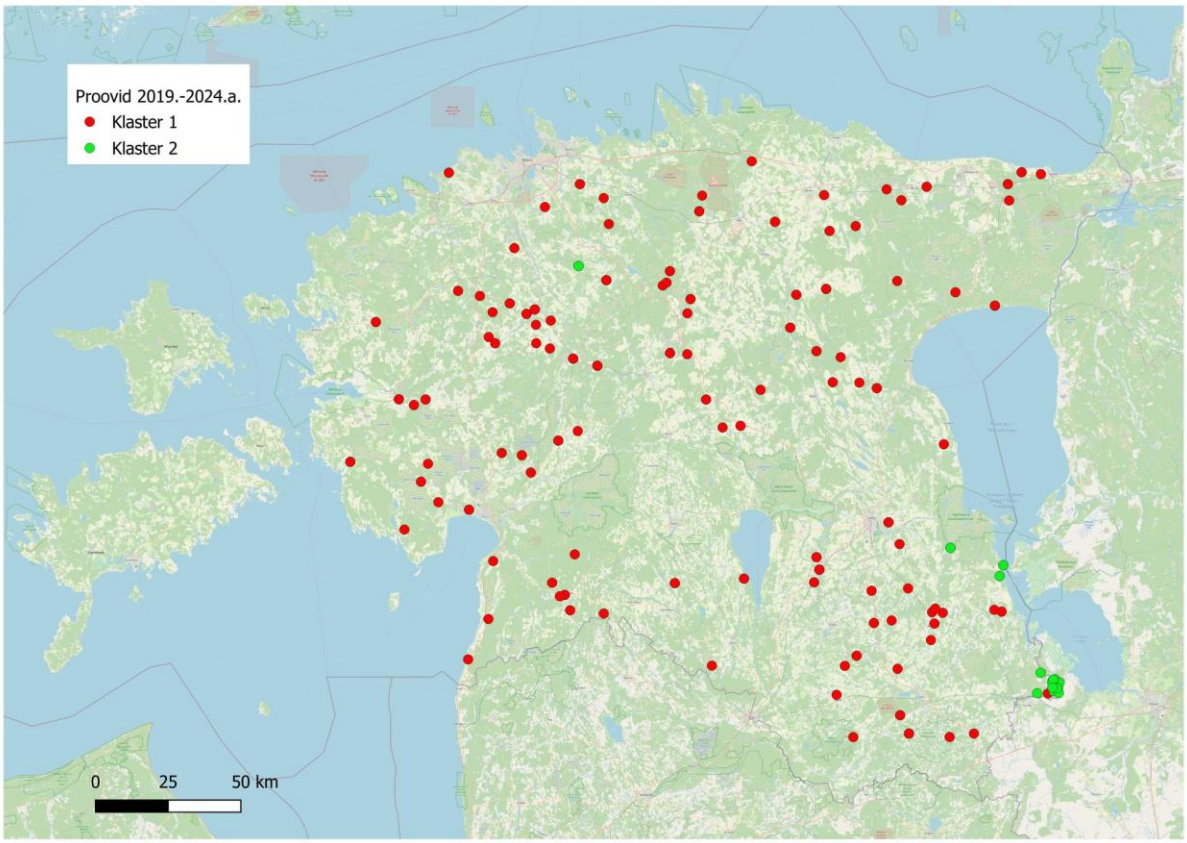
Joonis 8. 2014-2018 ajaperioodi proovide jagunemine geneetiliselt kolmeks klastriks (n=254). Esimene klaster on punane, teine klaster roheline ja kolmas sinine.



Joonis 9. Ajaperioodi 2014-2018 proovide (n=254) geograafiline jagunemine kolmeks klastriks, millest esimesse kuulub 78 hunti, teise 24 ja kolmandasse 152 hunti.

Ajaperioodi 2019-2024 proovide (n=246) jagunesid struktuurianalüüsi tulemusel kaheks geneetiliselt eristuvaks klastriks (Joonis 10 ja 11). Viimase ajaperioodi huntide H_e=0,79; H_o=0,66 ja A_R=14,0560.

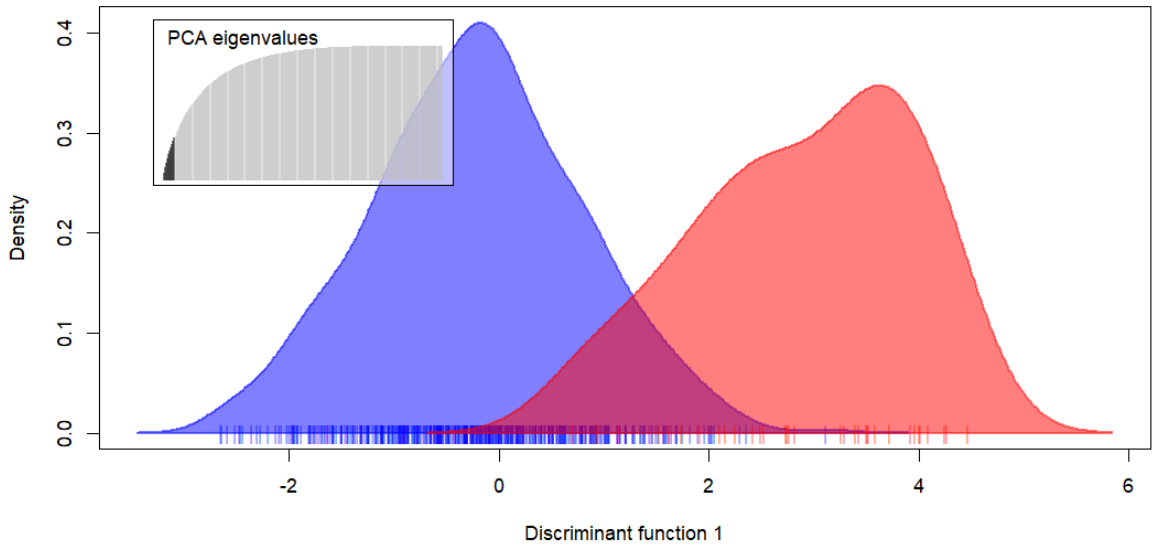
Joonis 10. 2019-2024 ajaperioodi proovide jagunemine geneetiliselt kaheks klastriks (n=246). Esimene klaster on punane, teine klaster roheline.



Joonis 11. Ajaperioodi 2019-2024 proovide (n=246) geograafiline jagunemine kaheks klastriks, millest esimesse (punane) kuulub 220 hunti, teise (roheline) 26 hunti.

4.3 Muud analüüsid

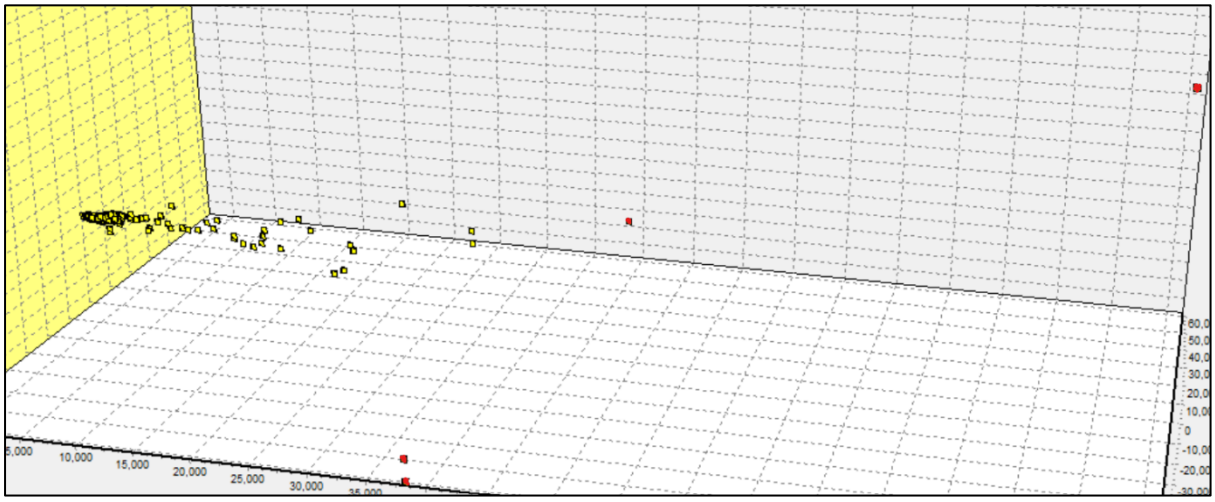
DAPC analüüsi tulemus kinnitas esialgse Structure tulemust koguvalimi kahte klastrisse jaotumise kohta (Joonis 12). Kuna joonis analüüsi tulemustest näitab, et klastrid üksteisega suurel määral ei kattu, siis järeldub, klastrid on üksteisest geneetiliselt üsna erinevad.



Joonis 12. Eesti hundipopulatsiooni (n=509) kaheks geneetiliselt erinevaks klastriks jagunemine (DAPC analüüsi tulemus). Geneetiline erinevus järeldub joonisel klastrite vähesest kattumisest. Suurem esimene klaster (n=475) on joonisel sinist värvi ja väiksem klaster 2 (n=34) punast värvi.

Lisainfoks viidi läbi sugulusanalüüs väljaheiteproovide vahel (n=27), mis olid kõik kogutud Saatse piirkonnast. Tulemused näitasid, et Saatse piirkonna hundid ei olnud enamasti sugulased, kuid mõned neist olid poolõed või -vennad.

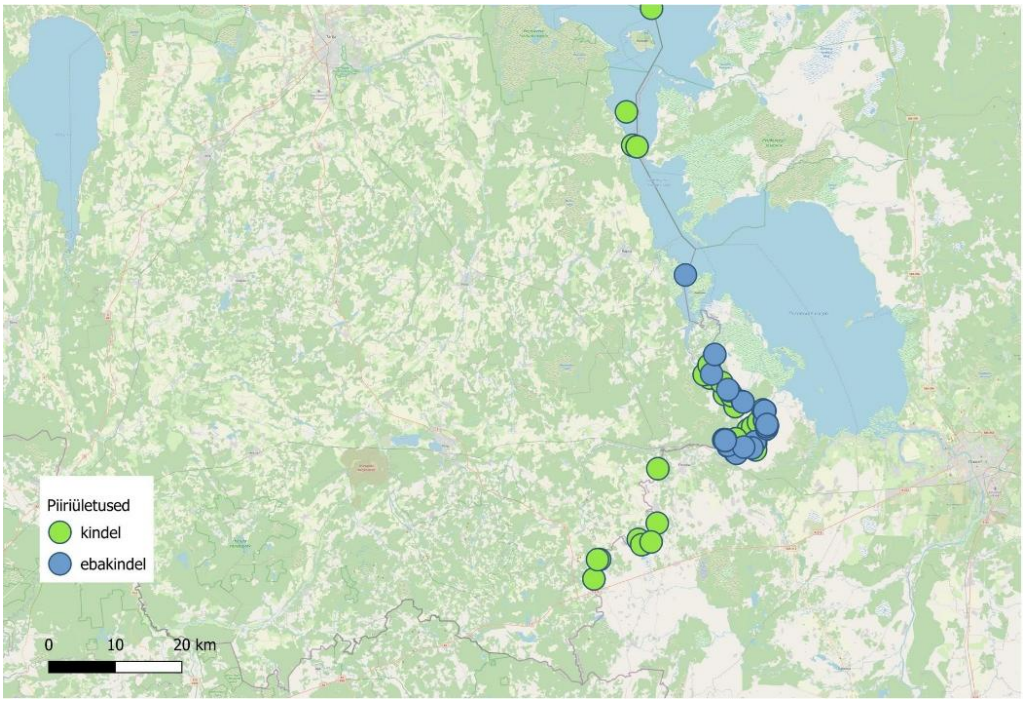
Paraku puuduvad käesoleva töö jaoks referentspopulatsiooni andmed (s.t. proovid Läti, Vene, Valgevene, Leedu, Poola ja Soome hundiasurkondadest), mille migrante tuvastada ja seetõttu ei anna otsese meetodiga analüüsimine selgeid tulemusi. Selle tõttu kasutati kaudseid meetodeid ja selleks, et leida valimis teistest proovidest geneetiliselt kaugemaid isendeid (kes on seetõttu potentsiaalsed migrandid asurkonnas) viidi läbi faktoriaal vastavusanalüüs (FCA, *Factorial Correspondence Analysis*), millest selgus neli võimalikku migranti (Joonis 13).



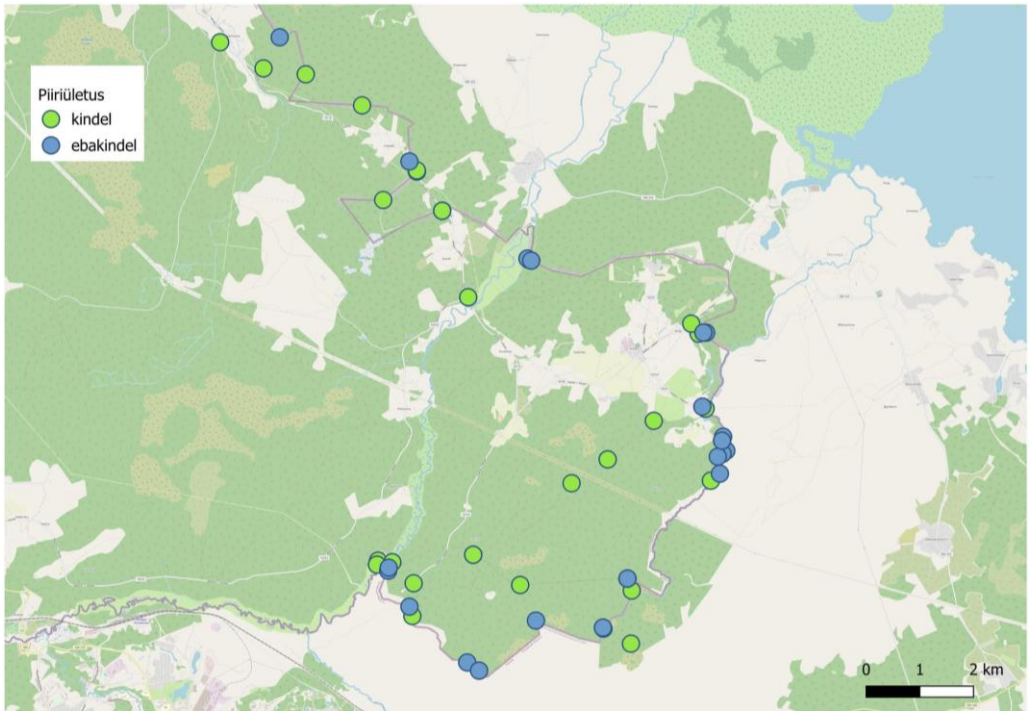
Joonis 13. Peakomponentanalüüsiga tuvastatud neli võimalikku migranti on märgitud joonisel punase, ülejäänud proovid kollase värviga (n=509).

4.4 Vaatlusandmete kokkuvõte

PPA töötajate poolt võimaldatud andmete põhjal koostati kaart huntide liikumistest Eesti-Vene piiri lähedal (Joonised 14 ja 15). Kokku vaadeldi Mustvee ja Saatse kordoni aladel huntide viibimist riigipiiri lähedal 113 korral. Vaatluste kirjelduste põhjal sai järeldada, et kindlalt liikusid hundid ajavahemikus detsember 2022 kuni jaanuar 2025 üle riigipiiri 81 korral. Enamik aega sattusid hundid vaatluse aluseks üksikult, kuid mõningatel kordadel nähti hunte üle piiri minemas ka kuuekesi (kahel korral) või kahe kuni neljakesti. See, kui kaua isendid kummalgi pool piiri aega veetsid, ei ole võimalik praeguste andmete põhjal teada.



Joonis 14. PPA töötajatelt saadud info-põhised vaatlused huntide piirilähedaste liikumiste kohta Eesti-Vene piirialadel. Rohelised punktid tähistavad asukohta, kus vaadeldav hunt ületas Eesti-Vene piiri kindlalt ja sinised punktid neid asukoht, mille puhul pole kindel, kas hunt ületas piiri, kuid selleks oli suur tõenäosus.



Joonis 15. PPA töötajate tehtud Saatse piirkonna hundivaatlused. Rohelised punktid tähistavad vaadeldud hunte, kes kindlalt ületasid riigipiiri; sinised piiri lähedal liikunud hunte, kelle piiriületuses ei saa olla päris kindel.

5. Arutelu

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on Eesti hundipopulatsioonis oleva geneetilise struktuuri ja dünaamika iseloomustamine ja määramine. Lisaks on töö eesmärgiks leida märke huntide piiriülese liikumise kohta ja mõista migratsiooni hulka Venemaa suunast. Magistritöös püstitatud eesmärgid said täidetud ja hüpoteesid leidsid kinnitust.

Mikrosatelliitmarkerid on üle genoomi paiknevad lühikesed kordusjärjestused, mida on varasemalt Euroopas palju kasutatud selleks, et uurida hundipopulatsioonide geneetilist mitmekesisust, populatsiooni struktuuri, geenisiiret, hübridiseerumist koertega ja sugulusristumisi omavahel. Ka varasemates Eesti hundipopulatsiooni geneetikat käsitlevates töödes on kasutatud mikrosatelliitmarkeritel põhinevat analüüsi, mis annab võimaluse käesoleva töö tulemusi varasematega võrrelda (Hindrikson *et al*., 2013; Plumer *et al*., 2016). See metoodika on olnud tõhus, kuna piisava arvu mikrosatelliitmarkerite korral on võimalik eristada üksikisendeid, tuvastada populatsiooni geneetilist struktuuri ja mitmekesisust ja ka inbriidingu ja hübriidide olemasolu.

Varasemates uuringutes on leitud, et Eesti hundipopulatsiooni geneetilise mitmekesisus on kõrge: 2013. a uuringus H_e = 0,73 ja H_o = 0,75 (Hindrikson *et al*., 2013) ja 2016. a uuringus H_e = 0,67 ja H_o = 0,66 (Plumer *et al*., 2016). Seekord on oodatava heterosügootsuse määraks 0,77 ja vaadeldava heterosügootsuse määraks 0,65. Esimene magistritöö hüpotees oligi, et hundipopulatsioon on mitmekesine ja heterosügootsus endiselt kõrge, seega osutus see tõeseks. Tuleb tähelepanu pöörata sellele, et oodatav heterosügootsus on praeguse valimi põhjal tunduvalt kõrgem kui varasemalt leitud, kuid vaadeldav heterosügootsus on langenud. Oodatav heterosügootsus näitab, et hundipopulatsiooni geneetiline mitmekesisus peaks olema nüüdseks tõusnud, kuid tegelikkuses seda tõusu andmetest näha pole. Eelnevalt leitud kõrget geneetilist mitmekesisust arvestades (Hindrikson *et al*., 2013; Plumer *et al*., 2016) on see ootamatu. Madalam H_o viitab sellele, et praeguses hundipopulatsioonis võib homosügoote olla rohkem kui heterosügoote, mis võib olla märk populatsiooni isoleeritusest. Tulemus on kooskõlas ka sellega, et populatsioon ei ole Hardy-Weinbergi tasakaalus. Eesti hundipopulatsioonis on sellise geneetilise mitmekesisuse muutuse üheks võimalikuks põhjuseks ka suur jahisurve (keskmiselt üle 30% populatsioonist).

Tuleb arvestada, et alla 0,5 langedes hakkab populatsiooni geneetiline mitmekesisus muutuma tervislikust juba kesiseks (Frankham, Ballou & Briscoe, 2010) ja seetõttu on erakordselt

oluline, et ka siit edaspidi Eesti hundipopulatsiooni geneetilist seisundit jälgitakse, et vajadusel (kui heterosügootsus näitab jätkuvat langustrendi) varakult ohustav tegur (kõrge küttimisurve, levikubarjäärid nagu näiteks Eesti-Vene piirialale ehitatavad piirirajatised) välja selgitada ja seejärel püüda selle mõju vähendada. Lisaks aitab dünaamiliste geneetilise mitmekesisuse languste-tõusude seire analüüsida faktoreid, mis populatsiooni geneetilist seisundit mõjutavad.

Töö teiseks hüpoteesiks olnud geenisiire Kagu-Eestis sai samuti kinnitust erinevate analüüside tulemusena, mis kõik viitasid geograafiliselt piiri ääres paiknevale varasemalt tuvastatud geneetilistest gruppidest erinevale grupile. Varasemates uuringutes on Eesti hundipopulatsioon jaotunud neljaks erinevaks klastriks (Hindrikson *et al*., 2013; Plumer *et al*., 2016), kuid käesolevas uuringus jaotus hundipopulatsioon kaheks klastriks, millest teine klaster (väiksem) asus piirile lähemal, samal ajal kui esimesse klastrisse määratud proovid paiknesid üle terve Eesti. Pärast esimese klastri eraldi analüüsimist selgus, et see jaguneb sarnaselt varasematele uuringutele kolmeks geneetiliselt eristuvaks grupiks, mille geograafiline jaotus sarnaneb varasemates uuringutes tuvastatud gruppide omale.

2014-2018 ajaperioodi proovide klasterdumine kolme rühma sarnanes geograafiliselt 2016. a uuringus kirjeldatud geneetiliste gruppidega (Plumer *et al*., 2016). 2019-2024 ajaperioodi klasterdumine kaheks sarnaneb klastrite suuruse ja geograafilise asetusega terve hundipopulatsiooni jaotumisega. See võib viidata viimase viie aasta jooksul muutunud geneetilisele dünaamikale ehk geenisiirdele Kagu-Eestist, sest kahest klastrist väikseim koondub geograafiliselt selle ajaperioodi puhul Eesti-Vene piiri lähedale. Samas tuleb arvestada, et kõige kindlamalt saaks geenisiiret kinnitada, kui oleks saadaval DNA proovid ka lähedal olevast Venemaa hundipopulatsioonist, kuid see võimalus puudus.

Kolmas hüpotees üksikute migrantide olemasolust populatsioonis sai küll kinnitust, kuid tuleks arvestada, et migrantide leidmiseks kasutati kaudset meetodit. Usaldusväärsema tulemuse saamiseks oleks vaja ikkagi kaasata analüüsi ka referentspopulatsioon (s.t. proove Läti, Vene, Valgevene, Leedu, Poola ja Soome hundiasurkondadest).

PPA töötajate kogutud vaatlusandmed huntide liikumisest Saatse aladel riigipiiri lähedal toetasid andmeanalüüsist saadud tulemust Kagu-Eestis toimuva geenisiirde toimumise kohta. Saatse kordoni aladel märgati huntide liikumist oluliselt rohkem kui Mustvee või Piusa kordonis. Enamus Saatse aladelt kogutud proovid kuulusid teise (väiksesse) klastrisse, mis andmeanalüüsi põhjal on geograafiliselt välja kujunenud viimase viie aasta jooksul.

Vaatlusandmetest saab järeldada, et huntide piiriülene liikumine Saatse kandis on võrdlemisi tihedam ja andmeanalüüs kinnitab ka teise klastri proovide leidumisega peale Saatse alade ka kaugemal Eestis (mõned proovid Põhja- ja Lääne-Eestis), et seal liikuvad hundid võivad olla naaberpopulatsioonist pärinevad isendid, kelle läbi toimub Eesti populatsiooni geenisiire.

Kokkuvõte

Huntide populatsioonigeneetika uurimine on oluline huntide piisava geneetilise mitmekesisuse säilitamiseks populatsioonis ning ka selleks, et tagada ökosüsteemi bioloogiline mitmekesisus läbi hundi ökoloogilise rolli. Eesti huntide asurkonna geneetilist seisundit on uuritud viimase kahekümne aasta jooksul ja tuleks uurida ka edaspidi huntidele mõjuva kõrge jahisurve ja tulevaste võimalike levimisbarjääride (piiriaiad, Rail Baltic) tõttu, millel võib olla hundipopulatsiooni geneetilisele mitmekesisusele negatiivne mõju. Käesoleva töö üldisteks eesmärkideks on analüüsida hundipopulatsiooni geneetilist mitmekesisust ja populatsiooni struktuuri ja selles toimuvat geenisiiret.

Töös analüüsiti 509 hundi DNA proovi, millest enamik olid Keskkonnaagentuuri poolt kogutud koeproovid, kuid väike osa oli ka Terioloogia töörühma liikmete Eesti-Vene piiri äärest kogutud väljaheiteproove. Proovidele teostati mikrosatelliitmarkereid (n=18) kasutades analüüs, mis viidi läbi programmidega Structure, Genetix, MLRelate jm. Geneetilisele infole lisaks kogusid PPA töötajad huntide liikumiste kohta Eesti-Vene piiril ka vaatlusandmeid.

Tulemused näitasid, et Eesti hundipopulatsioon jaguneb viimase kümne aasta proovide põhjal kaheks geneetiliselt eristuvaks klastriks, millest üks moodustus suuremast osast töös kasutatud proovidest ja teine klaster oli väiksem ja geograafiliselt suures osas Kagu-Eestisse koonduv. Valimit 5-aastaste perioodide kaupa analüüsides selgus, et perioodil 2014-2018 eksisteerinud kolm geneetilist klastrit sarnanesid 2016. aasta uuringus kinnitatud geneetiliste gruppidega. Viimase viie aasta valimi klasterdumine meenutas samas tervet valimit analüüsides saadud kahte klastrit. Eesti hundipopulatsiooni oodatav heterosügootsus on 0,77 ja vaadeldav 0,65; populatsioon ei ole Hardy-Weinbergi tasakaalus.

Kokkuvõtteks leiti, et Eesti hundipopulatsioon on endiselt geneetiliselt mitmekesine, kuid on märke, et populatsioonile mõjuv jahisurve ja asurkonna osaline isoleeritus võib olla tekitamas geneetilise mitmekesisuse langust võrreldes varasemaga. Andmeanalüüs ja kinnitatud arvukad vaatlused huntide Eesti-Vene piiri ületamistest kinnitasid, et Kagu-Eestis toimub naaberpopulatsioonist Eesti hundipopulatsiooni piiriülene liikumine. Töö tulemuste põhjal tuleks järeldada, et ka edaspidi tuleb Eesti hundi populatsioonigeneetikat uurida, et tuvastada populatsiooni elujõulisust ohustavaid tegureid.

Summary

Estonian wolf population genetics and transboundary connectivity with the Russian Federation

Studying population genetics of wolves is essential to maintaining a sufficient genetic diversity within the population and ensuring ecosystem biodiversity through the ecological role of wolves. The genetic status of the Estonian wolf population has been investigated over the past two decades and should be continued due to the high hunting pressure and potential future dispersal barriers (border fences along Estonian-Russian border, Rail Baltic), which may negatively impact the genetic diversity of the wolf population. The general objectives of this study are to analyze the genetic diversity and population structure of Estonian wolves, as well as the gene flow occurring within the population.

This study analyzed DNA samples from 509 wolves during 2014-2024, most of which were tissue samples collected by the Estonian Environmental Agency, while a smaller portion consisted of fecal samples collected by members of Mammalogy research team near the Estonian-Russian border. Microsatellite marker analysis (n=18) was conducted using programs such as Structure, Genetix, MLRelate, and others. Additionally, Estonian border guards collected observational data on wolf movements at the border (in Saatse, Mustvee and Piusa guard stations).

The results indicate that, based on data from the past ten years, the Estonian wolf population is divided into two genetically distinct clusters. The first cluster comprises the majority of the samples analyzed, while the second, smaller cluster, is primarily concentrated in southeastern Estonia. A five-year period-based analysis revealed that the three genetic clusters identified during 2014–2018 resembled the genetic groups confirmed by a 2016 study. However, in the last five years, the clustering pattern resembles the two-cluster structure observed when analyzing the entire dataset. The expected heterozygosity of the Estonian wolf population is 0.77, while the observed heterozygosity is 0.65. The population is not in Hardy-Weinberg equilibrium.

In conclusion, Estonian wolf population remains genetically diverse; however, signs indicate that hunting pressure and partial isolation might be leading to a decline in genetic diversity compared to previous years. Data analysis and numerous confirmed observations of wolves

crossing the Estonian-Russian border further support evidence of gene flow from neighboring populations into southeastern Estonia. Based on these findings, continued research on the population genetics of Estonian wolves is necessary to identify factors that may threaten the long-term viability of the population.

Tänuavaldused

Soovin väga tänada oma juhendajaid Maris Hindriksoni, Egle Tammelehte ja Kaari Susi asendamatu professionaalse juhendamise eest, kelle asjatundlikud nõuanded tegid töö õigeaegse valmimise võimalikuks. Lisaks olid Maris ja Egle ka suureks moraalseks toeks ja tegid töö tegemise oma entusiasmiga minu jaoks isegi veel huvitavamaks.

Suur tänu Keskkonnaagentuuri töötajale Inga Jõgisalule, kellelt saadud hundi koeproovid olid selle töö teostamiseks hädavajalikud.

Palju tänu Politsei- ja Piirivalveameti töötajatele koostöövalmiduse eest ning väärtusliku taustainfo kogumise eest, mis oli uuringu läbiviimiseks väga oluline.

Samuti tänan Terioloogia õppetooli liikmeid, kelle panus töö valmimisse avaldus nii väärtuslikes soovitustes, proovide kogumises välitöödel kui ka laboritööde juhendamises. Eriline tänu kuulub Kirke Raidmetsale varasemalt koeproovide DNA eraldamisel ning laboritöödel abiks olnud Urmas Saarmale, Kärtyn Kaljusalule ja Sharon Ihastele.

Viimaks tänan ka Raikko Prantsi toetuse eest töö tegemisel.

Kasutatud kirjandus

Åkesson, M., Flagstad, Ø., Aspi, J., Kojola, I., Liberg, O., Wabakken, P., & Sand, H. (2022). Genetic signature of immigrants and their effect on genetic diversity in the recently established Scandinavian wolf population. *Conservation Genetics, 23*, 359–373. https://doi.org/10.1007/s10592-021-01423-5

Åkesson, M., Liberg, O., Sand, H., Wabakken, P., Bensch, S., & Flagstad, Ø. (2016). Genetic rescue in a severely inbred wolf population. *Molecular Ecology, 25*(19), 4745–4756. https://doi.org/10.1111/mec.13797

Andersone, Z., Lucchini, V., Randi, E., & Ozoliņš, J. (2002). Hybridisation between wolves and dogs in Latvia as documented using mitochondrial and microsatellite DNA markers. *Mammalian Biology, 67*(2), 79–90. https://doi.org/10.1078/1616-5047-00012

Aspi, J., Roininen, E., Kiiskilä, J., Ruokonen, M., Kojola, I., Bljudnik, L., ... & Vila, C. (2006). Genetic structure of the northwestern Russian wolf populations and gene flow between Russia and Finland. *Conservation Genetics, 7*(4), 813–826. https://doi.org/10.1007/s10592-005-9053-2

Applied Biosystems. (2006). *Peak Scanner Software v1.0* [Computer software]. Thermo Fisher Scientific. https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4381867

Bai, Y., Liu, Q., & Wang, Y. (2023). Genetic diversity and the adaptation of species to changing environments. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 11(2), 1–5. https://www.hilarispublisher.com/open-access/genetic-diversity-and-the-adaptation-of-species-to-changing-environments-98028.html

Baltrūnaitė, L., Balčiauskas, L., & Åkesson, M. (2013). Genetic structure of wolves in Lithuania: implications for conservation. *Mammalian Biology, 78*(6), 419–425. https://doi.org/10.1016/j.mambio.2013.07.002

Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., & Bonhomme, F. (2004). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. *Laboratoire Génome, Populations, Interactions*, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.

Bragina, E. V., Ives, A. R., Pidgeon, A., Kuemmerle, T., Baskin, L., Gubar, Y. P., et al. (2015). Rapid declines of large mammal populations after the collapse of the Soviet Union. *Conservation Biology* 29, 844–853. doi: 10.1111/cobi.12450

Boitani, L., Kaczensky, P., Alvares, F., Andrén, H., Balys, V., Blanco, J. C., ... & Patko, L. (2022). *Assessment of the conservation status of the Wolf (Canis lupus) in Europe*. Strasbourg: Council of Europe. https://pureportal.inbo.be/en/publications/assessment-of-the-conservation-status-of-the-wolf-canis-lupus-in-

Card, D. C., Salguero-Gómez, R., Farrell, M. J., Moirón, M., Willoughby, J. R., Trisos, C. H., Cornwell, W. K., De Kort, H., Eitel, J. U. H., Leffler, E. M., Vellend, M., Waller, D. M., Hoban, S., Allen, J. M., Beissinger, S. R., Breed, M. F., Foden, W. B., Green, R. E., Hoffmann, A. A., & Bruford, M. W. (2024). Global erosion of genetic diversity within species. *Nature*, 627(8016), 786–792. https://doi.org/10.1038/s41586-024-08458-x

Chapron, G., & Treves, A. (2016). Blood does not buy goodwill: Allowing culling increases poaching of a large carnivore. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 283*(1830), 20152939. https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2939

Chapron, G., Kaczensky, P., Linnell, J. D. C., von Arx, M., Huber, D., Andrén, H., ... & Boitani, L. (2014). Recovery of large carnivores in Europe's modern human-dominated landscapes. *Science*, 346(6216), 1517–1519

Czarnomska, S. D., Jędrzejewska, B., Borowik, T., Niedziałkowska, M., Stronen, A. V., Nowak, S., ... & Pilot, M. (2013). Concordant mitochondrial and microsatellite DNA structuring between Polish lowland and Carpathian Mountain wolves. *Conservation Genetics, 14*(3), 573–588. https://doi.org/10.1007/s10592-013-0464-6

Di Bernardi, C., Chapron, G., Kaczensky, P., Álvares, F., Andrén, H., Balys, V., Linnell, J. D. C., López-Bao, J. V., Nowak, S., Ozolins, J., Reinhardt, I., Rigg, R., Shkvyria, M., Tsingarska, E., Wabakken, P., & Boitani, L. (2025). Continuing recovery of wolves in Europe. *PLOS Sustainability and Transformation, 4*(2), e0000158. https://doi.org/10.1371/journal.pstr.0000158

Frankham, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2010). *Introduction to conservation genetics* (2nd ed.). Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/CBO9780511808999

Godinho, R., Llaneza, L., Blanco, J. C., Lopes, S., Álvares, F., García, E. J., ... & Ferrand, N. (2011). Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology, 20*(24), 5154–5166. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05345.x

Hindrikson, M., Männil, P., Ozolins, J., Krzywinski, A., & Saarma, U. (2016). Bucking the trend in wolf-dog hybridization: First evidence from Europe of hybridization between female dogs and male wolves. *PLoS ONE*, 11(10), e0162510 . https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0046465

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*(10), e46465. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046465

Hindrikson, M., Remm, J., Pilot, M., Godinho, R., Stronen, A. V., Baltrūnaitė, L., ... & Saarma, U. (2017). Wolf population genetics in Europe: a systematic review, meta-analysis and suggestions for conservation and management. *Biological Reviews, 92*(3), 1601–1629. https://doi.org/10.1111/brv.12298

Jansson, E., Ruokonen, M., Kojola, I., & Aspi, J. (2012). Rise and fall of a wolf population: Genetic diversity and structure during recovery, rapid expansion and drastic decline. *Molecular Ecology, 21*(23), 5178–5193. https://doi.org/10.1111/mec.12013

Jansson, E., Ruokonen, M., Kojola, I., & Aspi, J. (2014). Genetic tracking of the origin of expanding wolf population in Finland. *Biological Conservation, 172*, 168–175. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.02.032

Jędrzejewski, W., Branicki, W., Veit, C., Meier-Augenstein, W., & Pilot, M. (2005). Genetic diversity and relatedness within packs in an intensely hunted population of wolves *Canis lupus*. *Acta Theriologica, 50*(1), 3–22. https://doi.org/10.1007/BF03192614

Jimenez, M.D., Bangs, E.B., Boyd, D.K., Douglas, W.S., Becker, S.A., Ausband, D.E., Woodruff, S.P., Bradley, E.H. Hoylan, J., Laudon, K. (2017). Wolf dispersal in the Rocky Mountains, Western United States: 1993–2008. *Journal of Wildlife Management*, 1(4):581–592. https://doi.org/10.1002/jwmg.21238

Jombart T., Devillard, S., Balloux, F. (2010). Multivariate Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) - Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* 11:94. https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94

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*(2), 576–579. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01256.x

Kolesnikov, V. V., Piminov, V. N., Ekonomov, A. V., Makarova, D. S., Strelnikov, D. P., Sinitsyin, A. A., et al. (2016). Perennial changes and distribution of resources the main species of hunting animals of Russian. *Agricultural Science Europe. North East* 6, 56–61.

Leonard, J. A., Vilà, C., & Wayne, R. K. (2014). Legacy lost: Genetic variability and population size of extirpated US grey wolves (Canis lupus). *Molecular Ecology, 14*(1), 9–17. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02106.x

Li, Y. L., & Liu, J. X. (2018). StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular Ecology Resources, 18*(1), 176–177. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12719

Liberg, O., Andrén, H., Pedersen, H. C., Sand, H., Sejberg, D., Wabakken, P., ... & Bensch, S. (2005). Severe inbreeding depression in a wild wolf (Canis lupus) population. *Biology Letters*, 1(1), 17–20

Muhly, T. B., Hebblewhite, M., Paton, D. G., Pitt, J. A., Boyce, M. S., Musiani, M., & Nielsen, S. E. (2019). Human activity helps prey win the predator-prey space race. *PLoS ONE, 14*(1), e0210715. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210715

Papp, O., Borda, C., & Szemethy, L. (2022). The role of wildlife corridors in maintaining genetic diversity: A review. *Ecological Indicators, 137*, 108693. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.108693

Pilot, M., Jedrzejewski, W., Branicki, W., Sidorovich, V. E., Jedrzejewska, B., Stachura, K., & Funk, S. M. (2006). Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Molecular Ecology*, 15(14), 4533–4553

Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J. M., Paetkau, D., Baudouin, L., & Estoup, A. (2004). GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity, 95*(6), 536–539. https://doi.org/10.1093/jhered/esh074

Plumer, L., Keis, M., Remm, J., Hindrikson, M., Jõgisalu, I., Männil, P., ... & Saarma, U. (2016). Wolves recolonizing islands: Genetic consequences and implications for conservation and management. *PLoS ONE, 11*(7), e0158911. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158911

Poyarkov, A. D., Korablev, M. P., Bragina, E., & Hernandez-Blanco, J. A. (2022). Overview of current research on wolves in Russia. *Frontiers in Ecology and Evolution, 10*, 869161. https://doi.org/10.3389/fevo.2022.869161.

Raidmets, K (2023). Hundi ja koera hübriidide tuvastamine eesti hundipopulatsioonis SNP-markerite paneeliga. Magistritöö. Tartu Ülikool.

Ražen, N., Skrbinšek, T., & Kos, I. (2022). Genetic consequences of population fragmentation in grey wolves in the Dinaric-Balkan region. *Conservation Genetics*, 23, 123–137

Ripple, W. J., Estes, J. A., Beschta, R. L., Wilmers, C. C., Ritchie, E. G., Hebblewhite, M., ... & Schmitz, O. J. (2014). Status and ecological effects of the world's largest carnivores. *Science*, 343(6167), 1241484

Rousset, F. (2008). Genepop'007: A complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources, 8*(1), 103–106. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x

Rutledge, L. Y., Patterson, B. R., Mills, K. J., Loveless, K. M., Murray, D. L., & White, B. N. (2010). Protection from harvesting restores the natural social structure of eastern wolf packs. *Biological Conservation*, 143(2), 332–339

Schlaepfer, D. R., Braschler, B., Rusterholz, H. -P., & Baur, B. (2018). Genetic effects of anthropogenic habitat fragmentation on remnant animal and plant populations: A meta-analysis. *Ecosphere*, 9(10), e02488. https://doi.org/10.1002/ecs2.2488

Szewczyk, M., Niedziałkowska, M., Nowak, S., & Jędrzejewska, B. (2019). The expansion of wolves into Western Poland: genetic diversity and population structure. *Mammal Research, 64*(1), 1–11. https://doi.org/10.1007/s13364-018-0392-8

Valdmann, H., Andersone, Z., Ozolins, J., Bagrade, G., & Kont, R. (2004). Status of large carnivore conservation and management in the Baltic States. *Acta Zoologica Lituanica, 14*(1), 15–20. https://doi.org/10.1080/13921657.2004.10512472

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes, 4*(3), 535–538. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x

Veeroja, R., Männil, P., Jõgisalu, I., Kübarsepp, M. (2024). Ulukisasurkondade seisund ja küttimissoovitus 2024.

Vilà, C., Walker, C., Sundqvist, A. K., Flagstad, Ø., Andersone, Z., Casulli, A., ... & Ellegren, H. (2003). Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. *Heredity, 90*(1), 17–24. https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800175

vonHoldt, B. M., Stahler, D. R., Smith, D. W., Earl, D. A., Pollinger, J. P., & Wayne, R. K. (2008). The genealogy and genetic viability of reintroduced Yellowstone grey wolves. *Molecular Ecology*, 17(1), 252–274

Wabakken, P., Sand, H., Liberg, O., & Bjärvall, A. (2001). The recovery, distribution, and population dynamics of wolves on the Scandinavian Peninsula, 1978–1998. *Canadian Journal of Zoology, 79*(4), 710–725. https://doi.org/10.1139/z01-039

Zanni, M., Ciucci, P., & Boitani, L. (2023). Infrastructure development and its effects on large carnivore connectivity in Europe. *Conservation Science and Practice, 5*(2), e12789. https://doi.org/10.1111/csp2.12789

Žunna, A., Ruņģis, D. E., Ozoliņš, J., Stepanova, A., & Done, G. (2023). Genetic Monitoring of Grey Wolves in Latvia Shows Adverse Reproductive and Social Consequences of Hunting. *Biology*, *12*(9), 1255. https://doi.org/10.3390/biology12091255

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kristiina Amur ,
(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

   Eesti huntide populatsioonigeneetika ja piiriülene seotus Vene Föderatsiooni populatsiooniga ,
   (lõputöö pealkiri)

   mille juhendaja(d) on Maris Hindrikson, Egle Tammeleht, Kaari Susi ,
   (juhendaja nimi)

   reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Kristiina Amur

27.05.2025