

Tartu Ülikool
Bioloogia-geograafiateaduskond
Zooloogia ja hüdrobioloogia instituut
Erizooloogia õppetool

Pauli Saag

**Suur- ja väike-konnakotka (*Aquila clanga* et *A. pomarina*, Acciptriformes:
Accipitridae) ristumine ja selle uurimine molekulaarsete markerite abil**

Magistritöö zooloogias

Juhendajad
Ph.D. Urmas Saarma
Ph.D. Ülo Väli

Tartu 2006

Sisukord

Sissejuhatus	3
1. Üldosa (kirjanduse ülevaade)	4
1.1. Hübridiseerumine ja selle tuvastamiseks kasutatavad molekulaarsed markerid	4
1.2. Kulliliste süstemaatika	8
1.3. Senised teadmised konnakotkaste geneetilise mitmekesisuse ja ristumise kohta	10
2. Materjal ja metoodika	12
2.1. Valim ja laboratoorne analüüs	12
2.2. Andmeanalüüs	15
3. Tulemused	16
3.1. DNA markerite alleelisagedused	16
3.2. Andmeanalüüs	19
4. Arutelu	22
5. Kokkuvõte	26
6. Summary	27
Tänuavaldused	27
Kasutatud kirjandus	28
Lisad	34
Lisa 1 Analüüsis kasutatud andmetabel	34
Lisa 2 Kodeeritud tunnuste tabel	36
Lisa 3 Programmi Structure analüüsi tulemused	40

Sissejuhatus

Suur-konnakotkas (*Aquila clanga*, Pallas 1811) ja väike-konnakotkas (*A. pomarina*, Brehm 1831) on morfoloogiliselt raskestieristatavad liigid (Forsman 1999), kelle määramist ja määratlemist raskendab veelgi asjaolu, et nad ristuvad (Lõhmus ja Väli 2001). Kuivõrd suur-konnakotkas kuulub ka ohustatud liikide hulka (Väli ja Lõhmus 2000, Meyburg *et al.* 2001), võib ristumine kujutada täiendavat ohtu populatsiooni säilimisele. Ohtu kujutavad endast nii hübriidse pesakonnaga kaasnev "raisatud" sigimispingutus kui ka võimalik liikidevaheline geenisiire (siin ja edaspidi pean ma silmas morfoloogilisi liike). Veel üks nüanss, mis probleemile aktuaalsust lisab, on tõik, et kahtluse alla on seatud ka konnakotkaste praegune paigutus süsteemis (Helbig *et al.* 2005a, Lerner ja Mindell 2005). Selleks, et anda looduskaitsele ja taksonoomilise soovitusi, tuleb esmalt välja selgitada tegelik olukord, ehk on tarvilik uurida, millise sagedusega toimub ristumine ja tagasiristumine. Sel eesmärgil asuti otsima liikide eristamiseks ja hübriidide tuvastamiseks sobivaid geneetilisi markereid. Liikide eristamiseks loodeti leida liigispetsiifiliste alleelidega lookused. Juhul kui neid leida ei õnnestu, on võimalik kasutada ka liikide vahel erinevaid alleelisagedusi. Ehkki tuuma-DNA markeritest on rohkem kasutatud AFLP-markereid (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) ja mikrosatelliite, asuti erinevusi otsima intronitest. Intronites olevate punktmutatsioonide analüüsimine on perspektiivne ja soodsalt juhul (kui saab kasutada restriksioonanalüüsi) ka suhteliselt odav meetod. Juhul, kui liikide vaheline geneetiline distant on väike ja ristumine (sh tagasiristumine) toimub sageli, võib hübriidiseerumise sageduse määramine osutuda üsnagi raskeks ülesandeks. Seetõttu taksonoomilistel ja looduskaitseprobleemidel peatuks üksnes põgusalt.

1. Üldosa (kirjanduse ülevaade)

1.1. Ristumine ja selle tuvastamiseks kasutatavad molekulaarsed markerid

Ristumisega kaasnevad negatiivsed mõjud. Esiteks on nii isendile kui ka liigile tervikuna kasulikum produtseerida “puhtatõulist” kui hübriidset (sageli viljatut) järglaskonda. Teiseks võib sagedane ristumine viia geneetilise distantse vähenemiseni liikide vahel või koguni ühe liigi hävimiseni. Ristumise tuvastamine geneetiliste markeritega on ideaaljuhul lihtne: kui kummalgi liigil on mingis lookuses fikseerunud mingi (ainult sellele liigile) spetsiifiline alleel, siis vanemliikide esindajad on homosügootse (“oma” alleeli suhtes) ja hübriidid heterosügootse genotüübiga. Kuid kui toimub tagasiristumine, või ei leita liigispetsiifilisi allele, siis ühestainsast lookusest ei pruugi piisata isegi liikide eristamiseks, rääkimata hübriidide tuvastamisest. Mõnel juhul tuleb usaldusväärsete tulemuste saamiseks omavahel võrrelda mitmekümne lookuse genotüübiandmeid (Väha ja Primmer 2006).

Väidetavalt on ristumist täheldatud 10% linnuliikide juures (Grant ja Grant 1992). Eri rühmades on omavahel segapaare moodustavate liikide osakaal väga erinev. Näiteks 40% haneliste liikidest on ristunud, samas kui kakulistest on hübriidiseerunud 0,7% ja piiritajaliste hulgast pole ristumise juhtumeid üldse teada (Grant ja Grant 1992). Ka haukaliste (kulliliste) hübriidiseerumise kohta on teateid vähe. Morfoloogia põhjal avaldatud artiklitest võiks nimetada kolme: lisaks sissejuhatuses mainitud A. Lõhmuse ja Ü. Väli (2001) tööle konnakotkastest veel üks samadelt autoritelt (Väli ja Lõhmus 2004) ja C. C. Farquhar’i (1998) artikkel mägiviur *Buteo polyosoma* ja puunaviu *B. poecilochrous* ristumisest, milles jõutakse järeldusele, et nende kahe liigi eristamine morfoloogiliste tunnuste alusel pole põhjendatud. Molekulaarseid meetodeid on kasutatud neljas artiklis, neist kolm on konnakotkastest: Ü. Väli (2002) artikkel perekonna kotkas (*Aquila*) mitokondri pseudo-kontrollregioonist, Väli jt (2004) ja Helbig’i jt (2005b) artiklid suur- ja väike-konnakotkast. Lisaks Lindbergi ja Nesje (2000) töö rabapistrikust (*Falco peregrinus*). Viimases uuriti jahikullikasvandustest lahtipääsenud lindude mõju kohalikule populatsioonile ja vaadeldi lähemalt juhtu, kus leiti koos pesitsemas raba- ja jahipistrik (*F. rusicolus*). Mikrosatelliitide abil õnnestus tõestada, et paari emalind oli sündinud kasvanduses erinevate rabapistriku alamliikide (*F. p. peregrinus* ja *F. p. pealei*) ristamisel ja kurna viljastanud isalind oli raba- ja jahipistriku hübriid. Autorid märgivad ka, et raba- ja jahipistriku hübriidide viljakus oli juba varem teada.

Teistes linnurühmades, nagu juba mainitud, võib ristumine olla märksa sagedasem. Enamasti esineb kahe liigi ristumist üksikjuhtudena, nii on see näiteks suitsupääsukese (*Hirundo rustica*) ja kaljupääsukese (*Petrochelidon fulva*) puhul (Haig *et al.* 2004), samuti täpikkaku ja ameerika metskaku (*Strix occidentalis* X *S. varia*) vahel (Martin ja Selander 1975), kodu- ja põldvarblase (*Passer domesticus* X *P. montanus*) vahel (Solberg *et al.* 2000) ja soo- ja mägikiuru (*Anthus*

pratensis X *A. spinoletta*) vahel (Bures *et al.* 2002). Näiteid võiks veelgi tuua, kuid märksa huvitavamad on liigipaarid, kellel hübriidiseerumist esineb regulaarselt. Nõgipardi (*Anas rubripes*) ja sinikael-pardi (*A. platyrhynchos*) ristumine on põhja-ameerikas väga tavaline ja toimub, nagu Ankney jt (1986) märgivad “kus iganes nad kohtuvad”. Ankney jt (1986) ei suutnud leida liigispetsiifilisi isosüümialleele (24 vaadeldud lookusest osutusid polümorfseteks 11) ja Nei geneetilised distantid eri populatsioonide vahel varieerusid samas vahemikus, kuhu mahtus ka liikidevaheline distant. Eri meetoditega saadud fenogrammid tulid küll natukene erinevad, kuid mõlemas olid nõgipartide ja sinikael-partide populatsioonid segiläbi, isegi ilma mingi geograafilise seaduspärata (Ankney *et al.* 1986). Mank jt (2004) tuvastasid mikrosatelliitide abil koguni nõgipardi ja sinikaela geneetilise distantse vähenemise viimase saja aasta jooksul.

Veel üks näide sagedasest ja suurel maa-ala toimuvast ristumisest on liigipaar hülgekajakas (*Larus glaucescens*) — kiltkajakas (*L. occidentalis*), kelle areaalid katavad kahe peale kokku Põhja-Ameerika läänerranniku Aleuudi saarestikust kuni California poolsaareni. D. A. Bell'i (1996) andmetel toimub ristumist tähelepanuväärse sagedusega (mõnes populatsioonis on hübriide üle 50%). Geneetilist varieeruvust uuriti isosüümide abil (liikidevahelisi erinevusi alleelides ei leitud) 33 populatsioonis, millest 14 leidis hübriidseid isendeid (Bell 1996). Segakolooniates toimus sugulasristumist suurema sagedusega kui ühe liigi kolooniates, mis tähendab, et päris vaba ristumist liikide vahel siiski ei toimu (segakolooniad moodustavad liikide vahel teatava barjääri). Esteraasi EST-2 lookuses esines üks alleel kõigis kolooniates, teine väiksema sagedusega alleel puudus sporaadiliselt mõnes koloonias, kuid kolmandat alleeli leidis vaid hübriidsetes kolooniates.

Hübriidiseerumine võib ulatuslikku geenisiiret esile kutsuda ka siis, kui toimub väga piiratud (võrreldes liikide levilatega) maa-alal. Rohwer jt. (2001) uurisid ristumist Põhja-Ameerika säälikutel (Parulidae). Vaadeldi laanesäälikut (*Dendroica occidentalis*) ja nulusäälikut (*D. townsendi*). Kolm kitsast hübriidsoonist esineb USA-s Washingtoni osariigi põhjaosas, kahte neist uuriti. Kokku määrati ligi 1200 sääliku (kahe liigi peale kokku) mtDNA haplotüübid. Kasutatud meetodiks oli RFLP ehk lõigatud fragmentide pikkuse polümorfismi uurimine. 663 isendil kasutati tervet mitokondriaalset genoomi, 591 isendil ainult tsütokroomi oksüdaasi (CO I) geeni järjestust. Tulemused olid hämmastavad: kui morfoloogiliste tunnuste järgi määrati hübriidsete tsoonide laiuseks ca 125 km, siis laanesääliku mitokondriaalseid haplotüüpe leiti hübriidsoonist isegi 2000 km kaugusel Alaska rannikul, kus elavad fenotüübiliselt puhtad nulusäälikud. Kuninganna Charlotte ja Walesi Printsi saartelt, mis asuvad ca 1000 km kaugusel algselt teada olnud hübriidsoonist, leiti koguni ainult laanesääliku haplotüübiga nulusäälikuid. Samas lõunasse (nulusääliku levila) ja itta ei ulatunud hübriidsoon geograafilise isolatsiooni tõttu (Kaljumäed) üle paarisaja kilomeetri.

Siiski esineb ka võrdlemisi stabiilseid hübriidsoone, kust rekombineerunud genotüübid väljapoole ei levi. Palju on uuritud must- ja kaeluskärbsenäpi (*Ficedula hypoleuca* X *F. albicollis*) hübriidiseerumist (Sætre *et al.* 1999, Veen *et al.* 2001, Primmer *et al.* 2002). Enamasti küll ökoloogilisest aspektist (miks ja millistel tingimustel hübriidiseerumine toimub), kuid hübriidide kindlakstegemisel ja paariväliste kopulatsioonide uurimisel (Veen *et al.* 2001) on kasutatud ka mikrosatelliite (isaduse selgitamiseks) üheaahelalise DNA konformatsiooni poümorfismi e. SSCP-d (pesapoegade soo määramiseks) kui ka mtDNA järjestusi (emalinnu liigi kindlakstegemiseks). Primmer jt. 2002 kirjeldasid ka 13 punktmutatsioonidega (*single-nucleotide polymorphism* e SNP) intronit, millest seitse olid kasutatavad liikide eristamiseks. Väga huvitavad ristumise ja genotüüpide leviku mustrid on leitud lehelindudel (*Phylloscopus spp.*). Väike-lehelinnul pesitseb Lääne-Euroopas alamliik *Phylloscopus collybita collybita* ja Hispaanias alamliik *P. c. brehmii* (ibeeria väike-lehelind). Kahe alamliigi laulud on erinevad (erinevusi leidub ka kehamõõtmetes), mistõttu on neid ka eraldi liikidena käsitletud (Helbig *et al.* 2001). S. Bensch jt avaldasid 2002 (a) aastal töö (alam)liikide kitsast (20 km) hübriidsoonist Pürenees, kus esineb vahepealse lauluga isendeid. Uuringus kasutatud isendid (N=69, ainult isased) jagati laulu järgi kolme rühma (*collybita*, *brehmii* ja vahepealne) ja seejärel genotüpiseeriti mitokondriaalse tsütokroom b järgi, kusjuures avastati viis puhta fenotüübiga isendit, kes mtDNA haplotüübi järgi oleksid pidanud kuuluma teise alamliiki. Seejärel tehti AFLP (amplifitseeritud fragmendi pikkuse polümorfism) analüüs. 13-st katsetatud AFLP markerist osutus informatiivseks neli, mille erinevaid kombinatsioone kasutades genotüpiseeriti kõik isendid uuesti. Selgus, et viiest “vale” lauluga (või mtDNA-ga, kuidas võtta) isendist vaid kaks sobisid nii mtDNA kui ka AFLP markerite järgi kindlasse alamliiki, ülejäänud kolm olid ilmselt hübriidid. Samas hübriidse fenotüübiga isenditest (N=9) olid kaks genotüübilt puhtad ibeeria väike-lehelinnud (*P. (c.) brehmii*). Asjaolu, et ei leitud ühtegi isendit, kelle mtDNA ja AFLP markerid omavahel vastuolus oleks olnud, viitab Haldane’i reegli kehtimisele (hübriidsetest isenditest on heterogameetne sugu, kelleks lindudel on emased, väiksema kohasusega võrreldes homogameetse sugupoolega). Sarnane tulemus saadi ka mikrosatelliitidega (Helbig *et al.* 2001), kuid kasutatud lookustes olid liikidevahelised erinevused väiksemad. Väike-lehelinnu alamliikide vahel on geneetilised distantid üsna suured, näiteks Rootsis (Hansson *et al.* 2000), kus lõunaosas elab *P. c. collybita* ja põhjaosas *P. c. abietinus*, leiti üks protsent erinevusi tsütokroom b järjestuses, ehkki neljas kasutatud mikrosatelliidilookuses erinevusi alamliikide vahel ei tuvastatud. Sealseid alamliikide areaale lahutab ligi 500 km, nii et ristumist ei toimu.

S. Bensch jt avaldasid 2002 (b) ka teise töö, milles kasutati AFLP meetodit. Sedapuhku olid uurimise alla võetud Rootsi salu-lehelinnud, kellel, nagu väike-lehelinnulgi, esineb Skandinaavias kaks alamliiki: lõunas *Phylloscopus trochilus trochilus* ja põhjas *P. t. acredula*. Nii salu- kui ka väike-lehelinnu Põhja- ja Lõuna-Skandinaavia populatsioonid on oma praegustele asualadele jõudnud eri teid mööda ja seda loodeti kajastuvat ka genotüüpides. Leiti üksainus informatiivne AFLP marker, millega saadi ootamatud tulemused: kui kahe alamliigi

vaheline piir jookseb läänest itta 62. laiuskraadi kandis, siis AFLP alleelide piir kulges hoopis kirdesse, nii et sisemaal oli enamuses *acredula* ja rannikul *trochilus* haplotüüp. Autorid arutlesid küll sellise olukorra tekkepõhjuste üle, kuid tunnistasid, et kuna publitseerimata andmetel on siberi *P. t. acredula* alamliigist lindudel fikseerunud *trochilus* alleel, siis fülogeograafilisi põhjusi on raske uskuda.

Tuumageenide introneid kasutasid oma töös ka N. M. Pacheco jt (2002), uurides kahe perekonna örd (*Brachyramphus*, Fam. Alcidae) liigi mets-kirjuördi (*B. marmoratus*) ja mägi-kirjuördi (*B. brevirostris*) võimalikku hübriidiseerumist. Ehkki ristumist tõestada ei õnnestunud (osalt ilmselt seetõttu, et ei uuritud ühtegi eeldatavalt hübriidse fenotüübiga isendit), sobis kasutatud meetod suurepäraselt liikide eristamiseks: kasutatud viies lookuses oli alleelide arv 6-21 (kahe liigi peale kokku), kusjuures liigid ei jaganud ühtegi alleeli. Ka tsütokroom b haplotüübid olid erinevad. Autorid avaldasid arvamust, et kahtlemata tuleb uurida ka võimalikke hübriide, kuid pigem on tegemist siiski ühe liigi värvusvariatsiooniga.

Nagu näha, on liikide eristamiseks ja ristumise uurimiseks kasutatud suurt hulka eri tüüpi markereid. Võib jääda mulje, et sobiva markeri leidmine pole kuigi keeruline. Värvuliste puhul võib see nii ollagi, kuid kulliliste lähedaste liikide eristamiseks sobivate markerite valimine on äärmiselt komplitseeritud. Peamine põhjus, miks on sobivate markerite leidmine nii raske, on paljude kulliliste võrdlemisi väike geneetiline varieeruvus (Negro ja Hiraldo 1994, Negro ja Torres 1999). On ka liike, kelle üldiselt väikese geneetiline heterogeensuse taustal on eri populatsioonid omavahel üsna erinevad (Nesje *et al.* 2000a, 2000b). Selle põhjusena tuuakse nii röövlindude toitumisstrateegiast tulenevaid väikeseid populatsioone (Barrowclough ja Gutiérrez 1990) kui ka 19.-20. sajandil (peamiselt “kullisõdade” ja pestitsiidimürgituse tõttu) tugevalt kõikunud arvukust (Nichols *et al.* 2001, Lifjeld *et al.* 2002). “Pudelikaelaefekt” (geneetilise heterogeensuse vähenemine arvukuse drastilise languse järel) on tavalisim teooria vähese liigisisese muutlikkuse seletamisel.

1.2. Kulliliste süstemaatika

Konnakotkad kuuluvad kulliliste e haukaliste seltsi (O. Accipitriformes) haugaslaste (Fam. Accipitridae) sugukonda. Ehkki haugaslaste süstemaatika kohta on ilmunud mitmeid töid, ei saa paraku öelda, et selles sugukonnas kõik suhted kindlalt välja selgitatud oleks. Näiteks kahtluse alla on seatud konnakotkaste praegune paigutus süsteemis (Helbig *et al.* 2005a, Lerner ja Mindell 2005). Kuna ka varem on tehtud ettepanekuid suurteks ümberkorraldusteks kulliliste süsteemis (Sibley ja Monroe 1990), on kohane anda ülevaade sellest, mis on välja selgitatud ja mis on viimastes uuringutes kahtluse alla seatud ning ka sellest, milliseid meetodeid on kasutatud.

Kõige põhjalikumalt on tõenäoliselt uuritud merikotkaste (*Haliaeetus*) süstemaatilist kuuluvust ja liikidevahelisi suhteid. 1995. aastal avaldasid A. Schreiber ja T. Weitzel töö, kus kasutati 27 isosüümilookust (neist ei sobinud liikide eristamiseks ainult kaheksa, kõigil teistel oli vähemalt ühel liigil teistsugune alleel, perekonnasiseselt polümorfseid olid kümme lookust). Aasta hiljem ilmus M. Wink jt (1996) sulest artikkel, kus lisandusid veel kaks merikotkaliiki ning võrdluseks suur hulk liike erinevatest perekondadest. Wink jt kasutasid isosüümide asemel tsütokroom-b DNA järjestust (tunnistades ausalt, et üheainsa lookuse kasutamine annab küsitava väärtusega tulemused). Schreiberi ja Weitzeli saadud dendrogrammid näitasid, et merikotkad on a) monofüleetiline klaad ja b) lähemas suguluses harksabade (*Milvus*), kui nn päris kotkastega (*Aquila*). Mõnevõrra erineva tulemuseni jõudsid Wink jt (1996) ning Lerner ja Mindell (2005), saades samuti merikotkastele lähimateks sugulasteks harksabad, kuid nende uurimustes jagunesid merikotkad kaheks haruks. Kõik kolm töörühma leidsid, et merikotka (*H. albicilla*) ja valgepea-merikotka (*H. leucocephalus*) võib lugeda sõsarliikideks, ning vöötsaba-merikotkas (*H. leucoryphus*) on nendega lähedalt seotud.

Põhjalik töö on tehtud viude (*Buteo*) süstemaatika uurimisel nii perekonna kui ka kõrgemal tasemel. Riesing jt (2003) kasutasid uuringus kõiki perekonna *Buteo* liike (mida on erinevatel andmetel 25-28) ja 10 viudega lähemas või kaugemas suguluses olevat liiki. Koos alamliikidega hõlmas uuring 61 taksonit. Liikide eristamiseks kasutati kahe mitokondriaalse markeri sekventse, kusjuures töö käigus avastati, et pseudokontrollregiooni mittekorduv osa on evolutsioneerunud umbes kaks korda kiiremini kui nikotiinamiid-adeniin-dinukleotiidi dehüdrogenaasi kuuenda subühiku (nd6) geen. Saadud dendrogrammide põhjal anti soovitusi leitud parafüleetilisuse kaotamiseks ning sarnaselt C. C. Farquhar'i (1998) tööga leiti, et mägiviu (*Buteo polysoma*) ja puunaviu (*B. poecilochrus*) eristamine pole põhjendatud.

Hiireviu (*Buteo buteo*) mitokondri kogujärjestuse võrdlemisel mitmete teiste liikide järjestustega (Haring *et al.* 2001) leiti, et kui kogujärjestuse poolest on hiireviu lähedasem valge-toonekurele (*Ciconia ciconia*) kui rabapistrikule (*Falco peregrinus*), siis mitokondri kontroll- ja pseudo-kontrollregioonid on viul ja pistrikul märksa sarnasemad. Sellest järeldub,

et ilmselt on haugaslaste (Accipitridae) lahknemine pistriklastest (Falconiidae) toimunud vahetult peale mõlema röövlindude haru lahknemist toonekurelistest (Ciconiformes).

Ka alamsugukonna Aquilinae (kuhu kuuluvad ka konnakotkad) süstemaatikast on ilmunud mitmeid töid, kuid tuleb tunnistada, et selle üksuse süsteem pole sugugi selgemaks muutunud, ehkki ilmselt on tegemist monofüleetilise rühmaga (Wink *et al.* 1996). Väli (2002), võrdles suur- ja väike-konnakotka, stepikotka (*Aquila nipalensis*), kääpakotka (*A. heliaca*) ja kaljukotka (*A. chrysaetos*) mitokondriaalse pseudo-kontrollregiooni järjestusi ja leidis, et omavahel on lähedasemad suur-ja väike-konnakotkas ning stepi- ja kääpakotkas. Mõlemad paarid jäid juurimata lähimnaabri (*neighbour-joining* meetodil saadud) puul kaljukotkast umbes ühekaugusele. 2005. a ilmus järjest kaks märksa põhjalikumaid artikleid, kus käsitleti kogu alamsugukonda (Helbig *et al.* 2005a) ja lisaks veel teisi haugaslaste rühmi (Lerner ja Mindell 2005). Mõlemas töös leiti, et perekond kotkas (*Aquila*) on parafüleetiline ning suur- ja väike-konnakotkas on hoopis lähedasemad harikotkale (*Lophaetus occipitalis*), kui teistele *Aquila* liikidele. Nood moodustasid klaadi koos mõnede haugaskotka (*Hieraaetus*) liikidega. Seega tuleb tõdeda, et ebamäärased ja täiendavat uurimist vajavad pole mitte ainult suur- ja väike-konnakotkaste omavahelised suhted, vaid ka nende asend süsteemis. Lõhmus ja Väli (2001) on soovitanud konnakotkaid käsitleda poolliikidena (*semispecies*). Et mitte hälbida ristumise uurimiselt taksonoomiliste vaidluste juurde, siis kasutan mina suur- ja väike-konnakotka liiginimesid üksnes morfoloogiliste tüüpide tähistamiseks.

1.3. Senised teadmised konnakotkaste geneetilise mitmekesisuse ja ristumise kohta

Suur-konnakotkaid arvatakse maailmas pesitsevat kuni 3000 paari ja seda alal, mis ulatub Läänemerest Vaikse Ookeanini. Väike-konnakotkaid on umbes 10 korda rohkem (vähemalt 20000 paari), kuid väike-konnakotka levila on üsna piiratud, hõlmates Kesk- ja Ida-Euroopa (Meyburg *et al.* 2001). Liikide areaalid kattuvad üsna laialt: Eestist Poola ja Valgeveneni. Kui lisada suur-konnakotka levilale ka üksikute segapaaride esinemiskohad, siis kahaneb väike-konnakotka levila allopatriline osa pea olematuks.

Eestis on vereproove võetud ja pesapoegade morfoloogilisi tunnuseid uuritud neljal suur-konnakotka pesitsusterritooriumil. Suur- ja väike-konnakotka segapaari pesitsusi on teada 12 territooriumilt, mitmel siiski ainult ühel aastal. Lennuvõimestunud on suur-konnakotkaid siiski rohkem kui hübriide. Väike-konnakotka pesitsusterritooriume on teada ca 400, enam kui sajast pesast on poegadelt kogutud ka geneetilist materjali. Hübridiseerumise teateid on peale Eesti veel Lätist, Valgevenest, Poolast ja Saksamaalt (Lõhmus ja Väli 2001, Dombrovski 2002, Helbig *et al.* 2005). Enamikul juhtudel moodustavad segapaari suur-konnakotka emalind ja väike-konnakotka isalind (Väli 2004, Helbig *et al.* 2005), on teada ka juhtumeid, kus üks paarilistest on ilmselt olnud hübriidset päritolu (Dombrovski 2002). Viimaste aastate jooksul on teada saadud mitmeid üllatavaid fakte, mis pole siiski aidanud kindlaks teha hübridiseerumise ulatust ja põhjust. Näiteks mitokondriaalse pseudo-kontrollregiooni uurimisel (Väli 2002) selgus, et vastu ootusi (ohustatud liikidel on geneetiline muutlikkus tihtipeale vähenenud (Suchentrunk *et al.* 1999)) on suur-konnakotka geneetiline heterogeensus antud mtDNA piirkonnas tunduvalt suurem kui väike-konnakotkal: seitse haplotüüpi kaheksal isendil 12 haplotüübi vastu 51 isendil, mis võib viidata kas hiljutisele arvukuse langusele või geenisiirdele naaberaladelt. Valimisse võeti ka hübriidsed isendid, kes mtDNA järgi jagunesid üheks väike- ja neljaks suurkonnakotkaks. Väli jt (2004) töös kasutati lisaks Eesti lindudele (N=80) ka Leedu (N=29) ja Kreeka (N=4) päritolu geneetilist materjali. Suur-konnakotkal õnnestus tänu suurenenud valimile (13 sekvensi, kasutati ka hübriidsete isendite mtDNA-d) avastada üks uus haplotüüp (ehkki Leedus ja Kreekas seda liiki ei leidu), väike-konnakotkal leiti 13 uut haplotüüpi. Kuna üks neist esines kõigi kolme piirkonna lindudel, arvasid autorid, et see võib viidata kogu väike-konnakotka kaasaegse populatsiooni pärinemisele viimase jääaja Balkani refuugiumist. Veel üks haplotüüp oli ühine Eesti ja Leedu väike-konnakotkatele, 23 ülejäänud haplotüüpi olid kõik lokaalpopulatsioonidele spetsiifilised (osa sellest võib olla valimivea põhjustatud). Väike-konnakotka viibimine jääajal ühesainsas refuugiumis ja kiire arvukuse kasv seletaksid ka vähest geneetilist heterogeensust võrreldes vähearvuka suur-konnakotkaga, kellel idapoolse liigina olid tõenäoliselt paremad tingimused jääaja üleelamisel: suurem arvukus või erinevad refuugiumid.

A. J. Helbig'ilt (2005b) õnnestus koguda vereproovid 61 väike-, 20 suur- ja kahelt hübriidselt konnakotkalt. Erinevalt Välist ei uurinud Helbig jt mitte mitokondri pseudokontrollregiooni, vaid kontrollregiooni hüpervarieeruvat regiooni (HVR-1). Peale mtDNA kasutati ka AFLP

markereid. Ühtegi liigispetsiifiliste alleelidega AFLP lookust ei leitud (polümorfseid lookusi leiti 41), kuid statistilise analüüsiga suudeti suur- ja väike-konnakotkaid ning hübriide siiski üksteisest eristada. MtDNA tulemused olid märksa huvitavamad. Mõlemad morfoloogilised hübriidid määrati ootuspäraselt (Väli 2004) suur-konnakotkasteks, kuid mtDNA järgi osutusid suur-konnakotkasteks ka viis morfoloogiliselt puhast väike-konnakotkast. Kolm neist pärinesid Saksamaalt, üks Poolast ja üks Lätist. Eestist on samuti kaks sellist isendit leitud.

Nagu juba mainitud, on varem katsetatud suur- ja väike-konnakotka ristumist ja populatsioonide geneetilist struktuuri uurida ka valguliste markeritega (isosüümid e. isoensüümid). Nendega töötamisest loobuti, kuna ei õnnestunud tuvastada polümorfismust (Saag 2003, 2004). Sarnane olukord, kus valguliste markerite varieeruvus puudub, on leitud ka Ibeeria kääpakotkal (*Aquila (heliaca) adalbeti*). J. J. Negro ja F. Hiraldo (1994) uurisid Ibeeria kääpakotkal 22 isosüümi lookust ega leidnud üheski polümorfismi, samas kääpakotka idapoolsel (alam)liigil *A. (h.) heliaca* varieerusid Schreiberi ja Weitzeli (1995) andmetel 27 lookusest kaks (mida kasutasid ka Negro ja Hiraldo). 2002. aastal avaldati 18 polümorfset mikrosatelliiti Ibeeria kääpakotka jaoks (Martinez-Cruz *et al.* 2002). Hilisemate uuringute käigus selgus, et keskmine alleelide arv lookuses pole väiksem kui idapoolsel kääpakotkal (Martinez-Cruz *et al.* 2004). Mitokondriaalsete haplotüüpide arv ja varieeruvus olid Ibeeria kääpakotkal mitu korda madalamad, kuid läbitud “pudelikaela” populatsiooni lähiajaloos ei peetud vähese geneetilise muutlikkuse põhjuseks, kuna arvukuse langusest on möödas liialt vähe põlvkondi, et efekt saaks avalduda (Martinez-Cruz *et al.* 2004).

2. Materjal ja metoodika

2.1. Valim ja laboratoorne analüüs

Analüüsideks kasutati Eestis aastatel 1997–2005 suur-konnakotka (N=17) ja väike-konnakotka (N=142) ja hübriidsetelt (N=16) pesapoegadelt võetud vereproove. Lisaks 1998. aastal Tallinna loomaaias suur-konnakotkalt ja 2005. a metsikult täiskasvanud suur- ja täiskasvanud väike-konnakotkalt võetud vereproove. Hübriidide staatus määrati morfoloogia ja mtDNA (Väli ja Lõhmus 2004) põhjal, mõnel pesal õnnestus jälgida ka eri liikidest vanalinde.

Liigispetsiifiliste lookuste leidmiseks prooviti 19 erinevat tuumageeni introni järjestust (igast geenist üks) ja mitokodri pseudokontrollregiooni järjestust (Väli 2002). Kasutatud lookused olid järgmised: aminolevulinaadi süntetaas (ALASY-8), adenülaadi kinaas (AK-1), B-kreatiini kinaas (BC-K), neuraalne sekreteeritud glükoproteiin (CEPUS), β -fibrinogeen (FIB), lamiin (LAMA-3), laktaadi dehüdrogenaas (LDH), lamiini retseptori prekursor (LRPP-40), ornitiini dekarboksülaas (ODC-78), rekombinatsiooni aktiveeriv geen (RAG-1), rodopsiin (RDPSN), transformeeriv kasvufaktor $\beta 2$ (TGF $\beta 2$), DLC-1 geen (1.6), tundmatu valgu järjestus (4.1), 26S ATPaasi kompleks (5.6), atsüül-koensüüm A dehüdrogenaas (7.1), MAGO-proteiin (8.4), kollapsiini vastuse mediaator (13.3) ja endoteeli differentseerumiskfaktor (17.2). BC-K ja TGF $\beta 2$ praimerite järjestused saadi kirjandusest (Bures *et al.* 2002), samuti ka ALASY-8, CEPUS, LAMA-3, LRPP-40, ODC ja RDPSN (Primmer *et al.* 2002) ning AK-1 ja RAG-1 (Helbig *et al.* 2005a), samas kirjeldatud PCR-i tingimused vajasisid tehniliste raskuste tõttu modifitseerimist. Lookused 1.6, 4.1, 5.6, 7.1, 8.4, 13.3 ja 17.2 on saanud oma numbrilised lühendid asukohtade järgi kana genoomis ja nende praimerid on välja töötatud Uppsala ülikoolis H. Ellegreni jt poolt.

Kõigis reaktsioonisegudes kasutati 10 μ l kohta 1-2 μ l (ca 2 ng) genoomset DNA-d, 0,5 U FIRE-pol Taq polümeraasi (Solis Biodyne), 0,2 mMol dNTP-sid, 1 μ l 10x reaktsioonipuhvrit (Solis Biodyne või Naxo), 0,6-1,2 μ l MgCl₂ (25 mMol/ μ l), 0,25-1 μ l kumbagi praimerit ja teistest komponentidest ülejäänud kogus vett. MgCl₂ ja praimerite (F ja R ühesuguse kontsentratsiooniga) lõppkontsentratsioonid lookuste kaupa on koondatud tabelisse 1.

Kasutati kahesuguseid PCR termilisi tsükleid. Esimene variant algas 2 min kuumutamisega 94° C juures, järgnes 36-38 tsüklit 30 s 94°, 30 s 52-65 ° (ALASY-8 64°, AK-1 57°, BC-K 55°, FIB 52°, LAMA-3 65°, LRPP-40 65°, LDH 57°, ODC-78 60°, RAG-1 59° ja TGF $\beta 2$ 65°) ja 40 s 72°, viimasele tsüklile järgnes 4 min 72°. Teine variant algas kuumutamisega 5 min 95° juures, järgnes 37 tsüklit 30 s 95°, 30 s 48-58° (1.6 48°, 4.1 57°, 5.6 58°, 7.1 ja 8.4 53°, 13.3 ning 17.2 51°) ja 1 min 72°, viimasele tsüklile järgnes 10 min 72° järjestuste pikendamiseks. Rodopsiini

praimereid katsetati erinevate reaktsioonipuhvrite, MgCl₂ kontsentratsioonide ja seondumistemperatuuridega, kuid puhast produkti ei õnnestunud saada.

PCR-il paljundatud DNA-järjestused puhastati eksonukleas I ja aluselise fosfataasi abil (EXO-SAP). Proovid sekveneeriti ABI PRISM 377 automaatsekvenaatoril, kasutades DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham) sekveneerimiskomplekti. Sekventsid joondati käsitsi või Clustal W algoritmi kasutades programmi Bioedit (Hall, 1999) abil.

AK-1, BC-K, LAMA-3, LRPP-40, ODC-78, RAG-1 lookuste sekventside kõrvutamisel liikidevahelisi erinevusi ei leitud. CEPUS-geenist õnnestus sekveneerida vaid üks järjestus, ALASY-8 ja rodopsiin ei andnud PCR-il sekveneerimiseks sobivat produkti. Transformeeriva kasvufaktori TGFβ2 intronist leiti suur-konnakotkal kaks punktmutatsiooni võrreldes väike-konnakotkaga, millest üks tekitas liigispetsiifilise restriksioonikoha Cai I ensüümile. Paraku osutus alleelisageduste määramine restriksioonanalüüsil võimatuks. Kuna rohkemate proovide sekveneerimine tehniliste probleemide tõttu samuti ei õnnestunud, polnud võimalik otsustada, kas restriksioonanalüüs ebaõnnestus tehniliste probleemide tõttu, või tuleb liigispetsiifilise lõikekoha leidmist pidada artefaktiks.

LDH geeni alleelisagedused määrati otse sekventsidelt. FIB intronis leiti kaks alleelispetsiifilist restriksioonikohta ning lõikamiseks kasutati ensüüme Mbo II ja Ssp I (MBI Fermentas). Lookustes 1.6, 4.1, 5.6, 7.1, 8.4, 13.3 ja 17.2 leiti igas üks liigispetsiifiline lõikekoht. Restriktaasideks olid vastavalt 1.6 - Alw 21 I, 4.1 - Mbo II, 5.6 - Mnl I, 7.1 - Van 91 I, 8.4 - Nhe I, 13.3 - Bau I ja 17.2 - Alw 26 I. Reaktsioonitingimused ja -aeg võeti vastavalt tootja juhendile. DNA fragmendid lahutati agarosgeelelektroforeesil, homo- ja heterosügootid määrati silma järgi. FIB ja LDH lookustes nimetati "A" alleeliks suur-konnakotkal ja "B" alleeliks väike-konnakotkal sagedasem alleel. Teistes lookustes nimetati "A"-ks ensüümi lõikekohata ja "B"-ks lõikekohaga alleel.

Tabel 1.

Analüüsil kasutatud lookuste praimerid ja neile sobivad reaktsioonitingimused.

Lookus	F Praimeri järjestus	R Praimeri järjestus	Seondumis t °C	Praimeri lõplik C pMol/µl	MgCl ₂ lõplik C mMol/µl	Restriktaas
ALASY-8	ATTGCCCGAGTCACATCATT	GGTCATCAGCTTGTCTCAGAC	64	0.5	?	
AK-1	ACCCAAACAGGGTCTAAACTG	CTTCTTGATGGTCTCCTCGT	57	0.4	2	
BC-K	GCTTCACCTGGATGATGC	CGTCGCCAGCTACGCATCCT	55	0.25	2	
CEPUS-1	CGAGTCAAAGTCACCGTCAA	CTCTTCGCATCCGAGATGTA	64	0.4	1.5	
FIB	GGAGAAAACAGGACAAATGACAATTAC	TCCCCAGTAGTATCTGCCATTAGGGTT	52	0.32	2	MboII/SspI
LAMA-3	CCAAGAAAGCAGCTGCAGGATGAGATGC	CTGCCGCCCCGTTGTCGATCTCCACCAG	65	0.4	2	
LDH	AGCATGGGAGCTTGTTCCTT	CTTCCTGTGACGAAACACCT	57	0.5	2	
LRPP-40	GGGCCTGATGTGGTGGATGCTGGC	GCTTTCTCAGCAGCAGCCTGCTC	65	0.4	1.5	
ODC-78	GACTCCAAAAGCAGTTTGTGCTCTCAGTGT	TCTTCAGAGCCAGGGAAGCCACCACCAA1	60	0.4	2	
RAG-1	CTGAATGGAAATTCAAGCTGTT	ACAGTTGTGACAAAATTGAGTGG	59	0.5	1.5	
RDPSN	TGCTACATCGAGGGCTTCTT	CGAGTGACCAAGAGAGCGATT	?	0.5	?	
TGFB2	GAAGCGTGCTCTAGATGCTG	AGGCAGCAATTATCCTGCAC	65	0.25	3	
1.6	GACCTTCCAGAAAGCTATTGC	TCGTGAAGAACACAGTGAAAG	48	0.25	2.5	Alw2II
4.1	GACACAATGAGCAACACTAC	GCTTCACTCGCCATTTCTTG	57	0.25	2.5	MboII
5.6	GGAGTCCTGATGGATGACAC	GGTGGCTTTATACCCCATCTC	58	0.25	2.5	MnII
7.1	CCCTACATTGCAAACTATGG	AGAATCCAGTCACTTCCATC	53	0.25	2.5	Van9II
8.4	GACGAGCACATCTCCTTTAC	TGGACCAGGTAGTAGAACAC	53	0.25	2.5	NheI
13.3	AAGCAGAAAGCTGTCTTCCG	CAGTTCCTGGTCCAGTAGTG	51	0.25	2.5	BauI
17.2	CAGAAAGAGCTGCACCATG	TTCTGATTCGTAGTCAGC	51	0.25	2.5	Alw26I

2.2. Andmeanalüüs

Saadud genotüübiandmete analüüsimiseks ja isendite päritolu määramiseks (suur- ja väikekonnakotkad või hübriidid) kasutati kladistikaprogramme PAUP 4.0b10 (Swofford 1998), MrBayes 3.0b4 (Huelsenbeck ja Ronquist 2001) ning mudelipõhiseid (ja Markovi ahelaid e *MCMC* kasutavaid) populatsioonigeneetikaprogramme Structure (Pritchard *et al.* 2000) ja Newhybrids 1.1b (Anderson 2002). Analüüsis kasutati lisaks tuuma DNA tunnustele (FIB, LDH, 1.6, 7.1, 8.4) ka mtDNA andmeid. Esialgselt valimist kasutati analüüsis ainult isendeid, kelle kohta oli teada vähemalt kolme molekulaarse tunnuse seisundid. Saadud andmematriks (vt lisad 1 ja 2) sisaldas kuus tunnust ja 65 isendit, neist 19 suur-konnakotkad, 16 hübriidid ja 30 väike-konnakotkad.

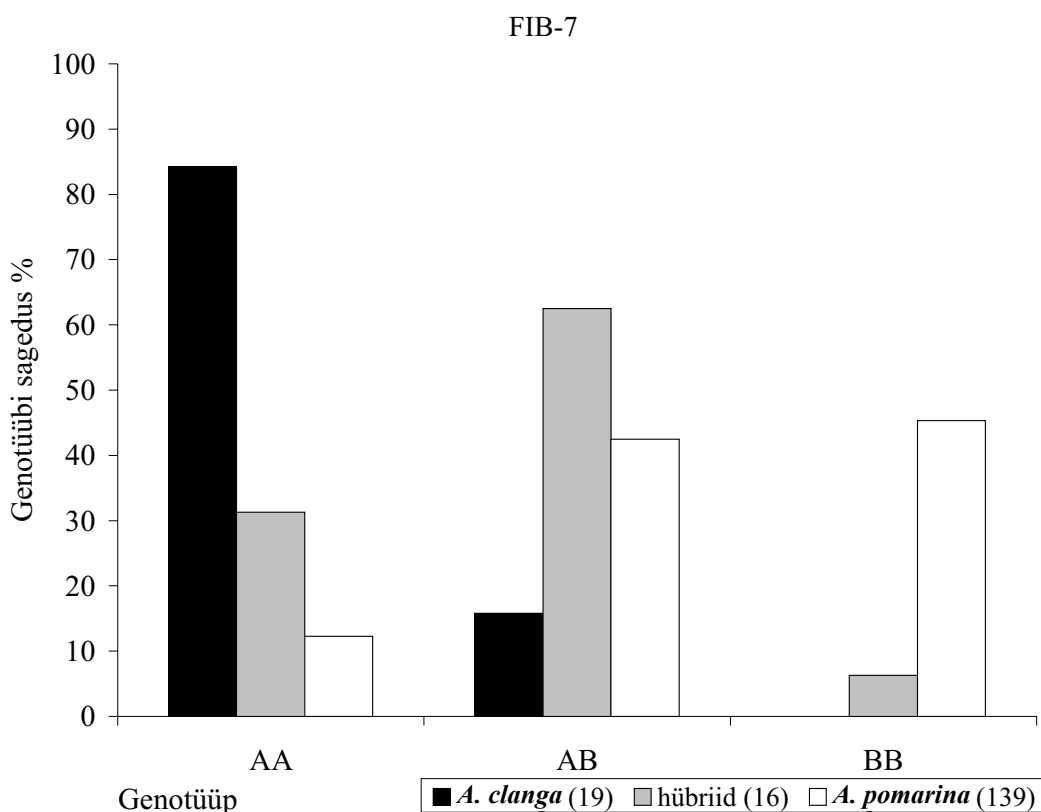
Kõigi kasutatud programmidega tehti proovianalüüs programmide autorite poolt soovitatud seadetega. Programmil PAUP lasti genereerida puid nii säästiprintsiibil (*maximum parsimony*) kui ka lähimnaabri (*neighbour-joining*) meetodil, MrBayes kasutab maksimaalse tõepära meetodit (*maximum likelihood*). Kladistikaprogrammidega (PAUP ja MrBayes) ei õnnestunud saada analüüsijaid rahuldavat tulemust st eristada liike ja hübriide. Eri liikidest ja (eeldatavasti) hübriidset päritolu isendid paigutusid saadud kladogrammidel segiläbi. Hea toetusega klaade moodustasid vaid samade pesitsusterritooriumide erinevate aastate noorlinnud, võib-olla tänu ühistele esivanematele. Programm Newhybrids suutis küll ootuspäraselt rühmitada suur- ja väike-konnakotkad, kuid ei olnud võimeline leidma ei hübriide ega tagasiristandeid (määras need vanemliigist isenditeks). Kui andmetest jäeti välja MtDNA andmed, siis suutis algoritm hübriidid küll ära tunda, kuid nende hübriid olemise tõenäosus jäi siiski alla 50 protsendi. Ilmselt vajab ka see programm suuremat lookuste hulka ja suuremaid liikidevahelisi alleelisageduse erinevusi. Parimad tulemused saadi programmiga Structure. Paraku jäi ka selle programmi lahutusvõime loodetust väiksemaks. Mõnede lookuste analüüsist välja jätmine tulemusi oluliselt ei mõjutanud. Igalt pesitsusterritooriumilt üheainsa isendi valimisse jätmine (viis suur-konnakotkast, 11 hübriidi ja 29 väike-konnakotkast) mõnevõrra halvendas lahutuvust (tõenäoliselt valimiveast põhjustatuna).

Pärast mõningat katsetamist jäädgi programmi Structure järgmiste seadete juurde: infot isendi kindlasse liiki (populatsiooni programmi käsitluses) kuulumise kohta ei kasutata (*popinfo*=0), populatsioon on kaks ($K=2$), lubatud on ristumine (*admixture*), alleelisagedus eri populatsioonidel on sõltumatu, analüüsi sissejuhatav osa (*burnin*) 10 000 arvutust ja analüüsi andmete kogumise osa (*after burnin*) 100000 arvutust, programm teeb ühe korduse e “jooksu”. Antud analüüsi jaoks parimate programmi seadete otsimisel tehti iga kord mitu kordust, kuid kuna eri kordustel saadud tulemused erinesid üksteisest väga vähe, ei peetud viimase analüüsi tegemisel mitme korduse keskmise võtmist vajalikuks.

3. Tulemused

3.1. DNA markerite alleelisagedused

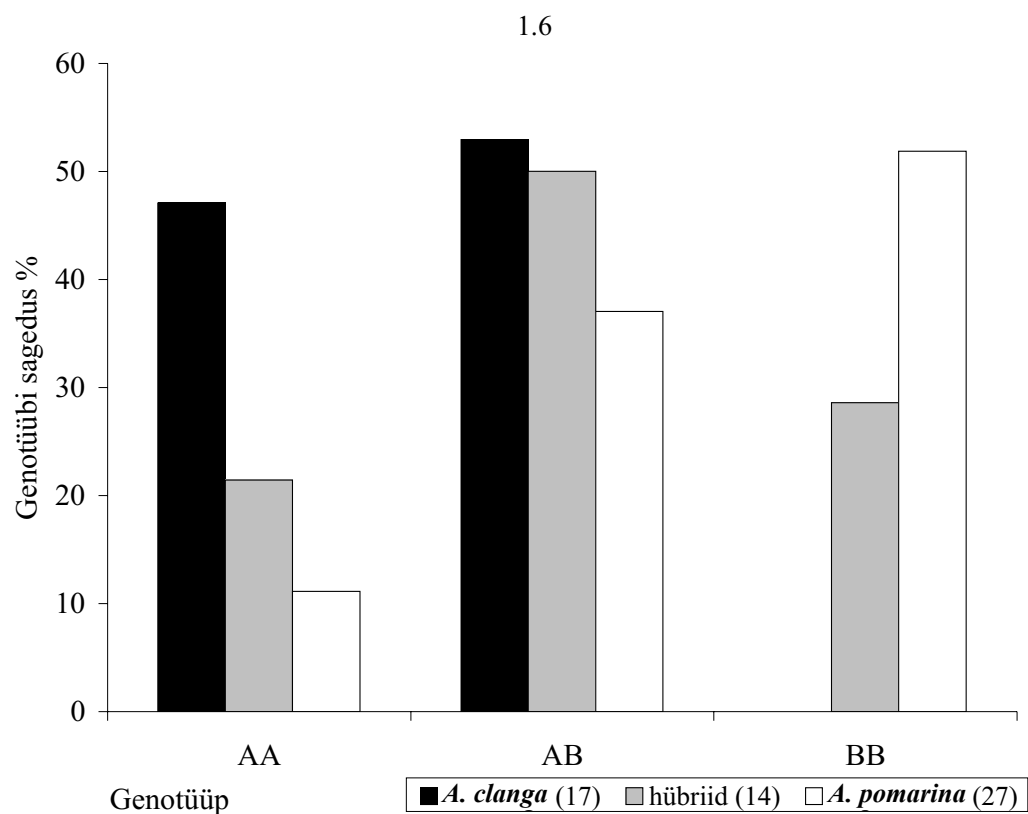
Fibrinogeeni seitsmendas intronis leitud viis mutatsiooni, millest kaks andsid alleelispetsiifilised lõikekohad Mbo II ja Ssp I restriктаasidele. Kokku analüüsiti 174 isendit ning ei leitud ühtegi “B” alleeli suhtes homosügootset (BB) suur-konnakotkast (joon 1), küll aga 17 “A” alleeli suhtes homosügootset (AA) väike-konnakotkast ning edasisel analüüsil selgus, et “A” ja “B” alleelid on väike-konnakotkal tasakaalus (jaotunud vastavalt Hardy-Weinbergi võrrandile).



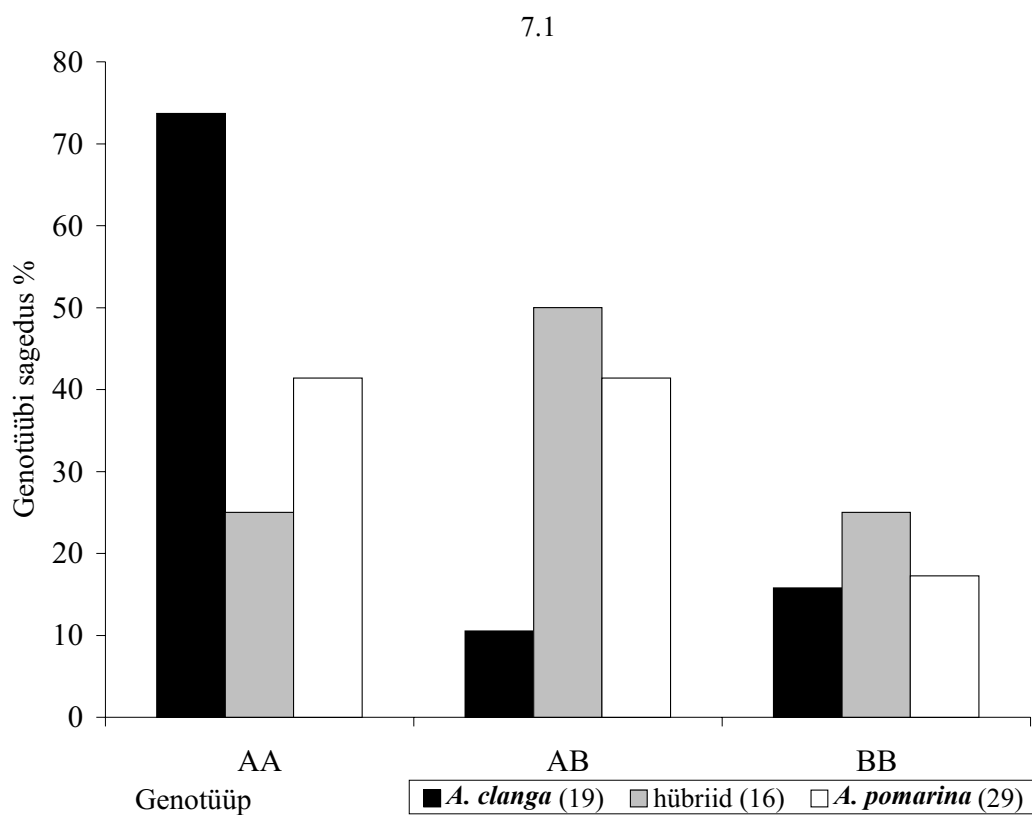
Joonis 1. Fibrinogeeni genotüüpide jaotus konnakotkastel.

Lookustes 1.6, 4.1, 5.6, 7.1, 8.4, 13.3 ja 17.2 leiti igas üks liigispetsiifiline lõikekoht. Restriктаasideks olid vastavalt 1.6 - Alw21I, 4.1 - MboII, 5.6 - MnlI, 7.1 - Van91I, 8.4 - NheI, 13.3 - BauI ja 17.2 - Alw26I. Tehniliste raskuste tõttu lookuste 4.1, 5.6, 13.3 ja 17.2 restriksioonanalüüs ebaõnnestus ja andmanalüüsi alustamise ajaks oli jõutud genotüpiseerida ainult mõned isendid. See eest lookused 1.6, 7.1 ja 8.4 analüüsiti enam kui 60 isendil.

Lookuses 1.6 ei leitud ühtegi “BB” homosügootset suur-konnakotkast, ehkki heterosügootte oli rohkem, kui “AA” homosügootte (joon 2). Väike-konnakotkastel olid kõigis kolmes (1.6, 7.1, 8.4) lookuses alleelid omavahel Hardy-Weinbergi tasakaalus. Hüpriidide heterosügootsuseks igas lookuses tuli ootuspäraselt vähemalt 50 protsenti (joon 2, 3, 4), ehkki kõigi kolme lookuse suhtes olid heterosügootsed ainult kaks isendit.

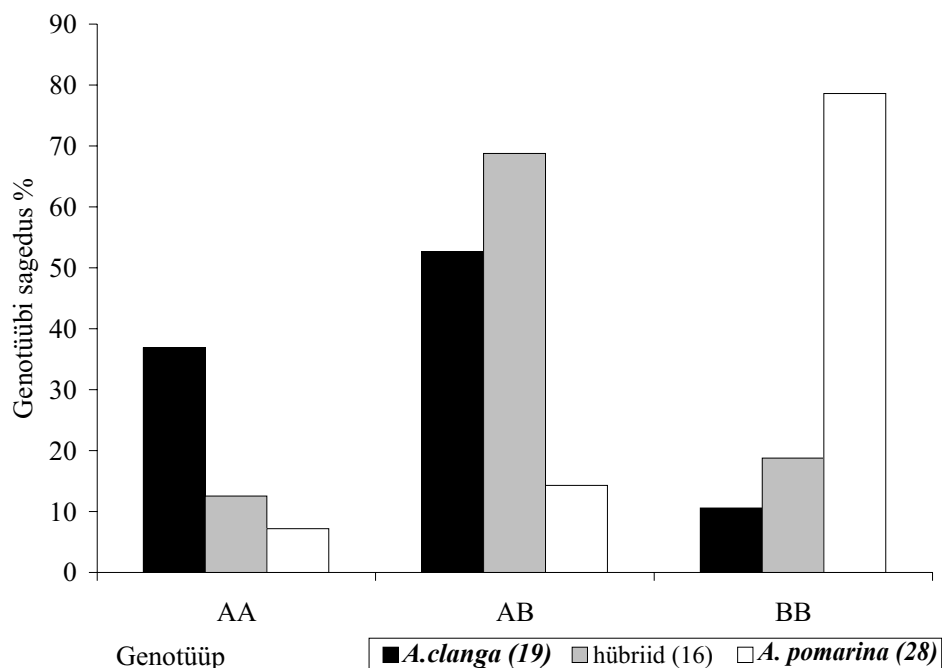


Joonis 2. Lookuse 1.6 genotüüpide jaotus konnakotkastel



Joonis 3. Lookuse 7.1 genotüüpide jaotus konnakotkastel

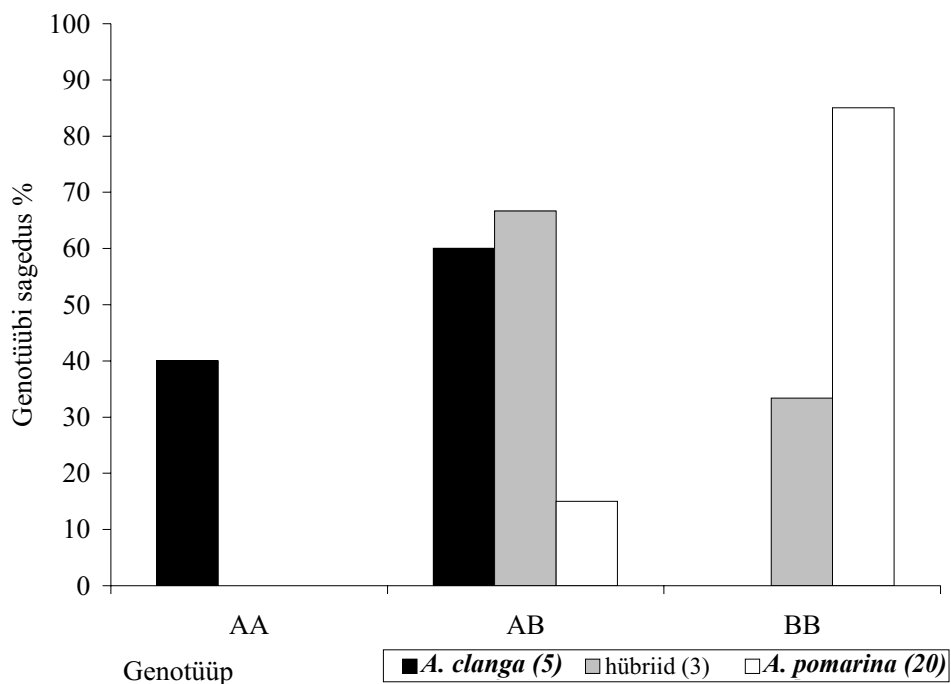
8.4



Joonis 4. Lookuse 8.4 genotüüpide jaotus konnakotkastel

Laktaadi dehüdrogenaasi (LDH) intronis tuvastati suur-konnakotkal üks punktmutsatsioon võrreldes väike-konnakotkaga. Sekveneerida õnnestus 28 isendi DNA järjestused. Ei leitud ühtegi “AA” homosügootset väike-konnakotkast ega ka “BB” homosügootset suur-konnakotkast (joon 5).

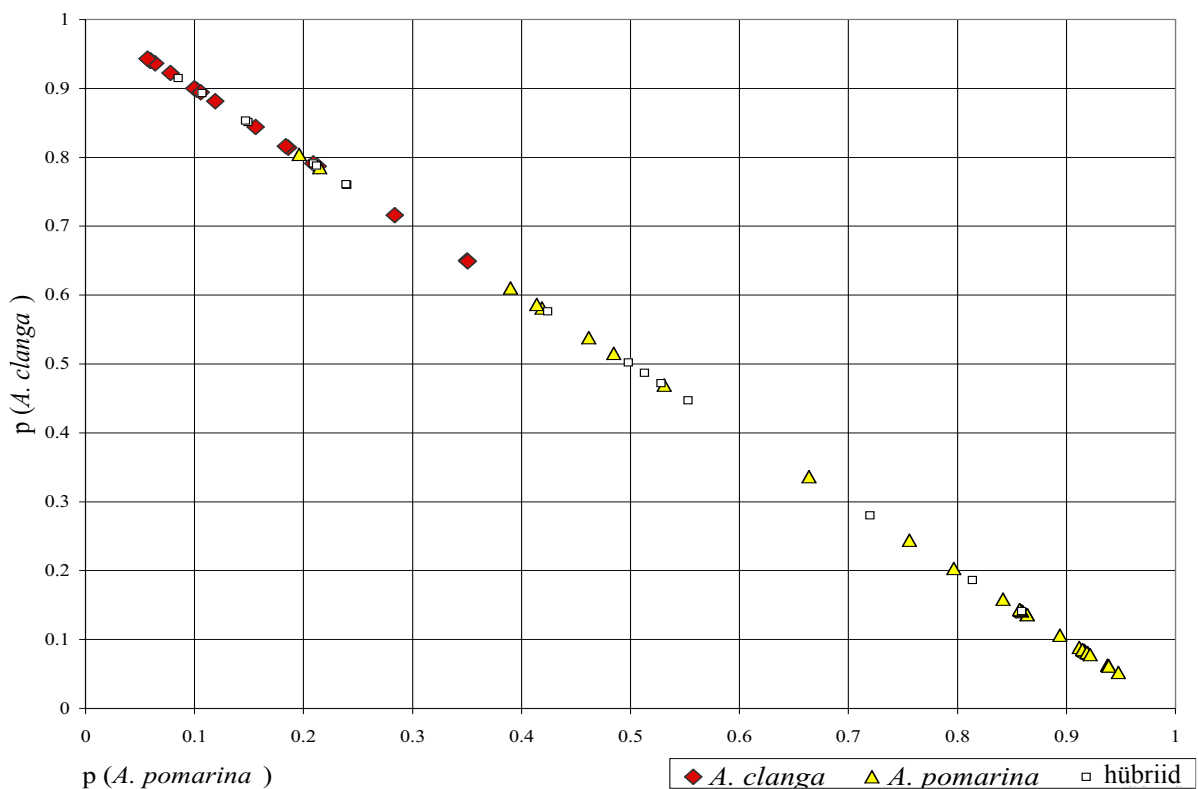
LDH



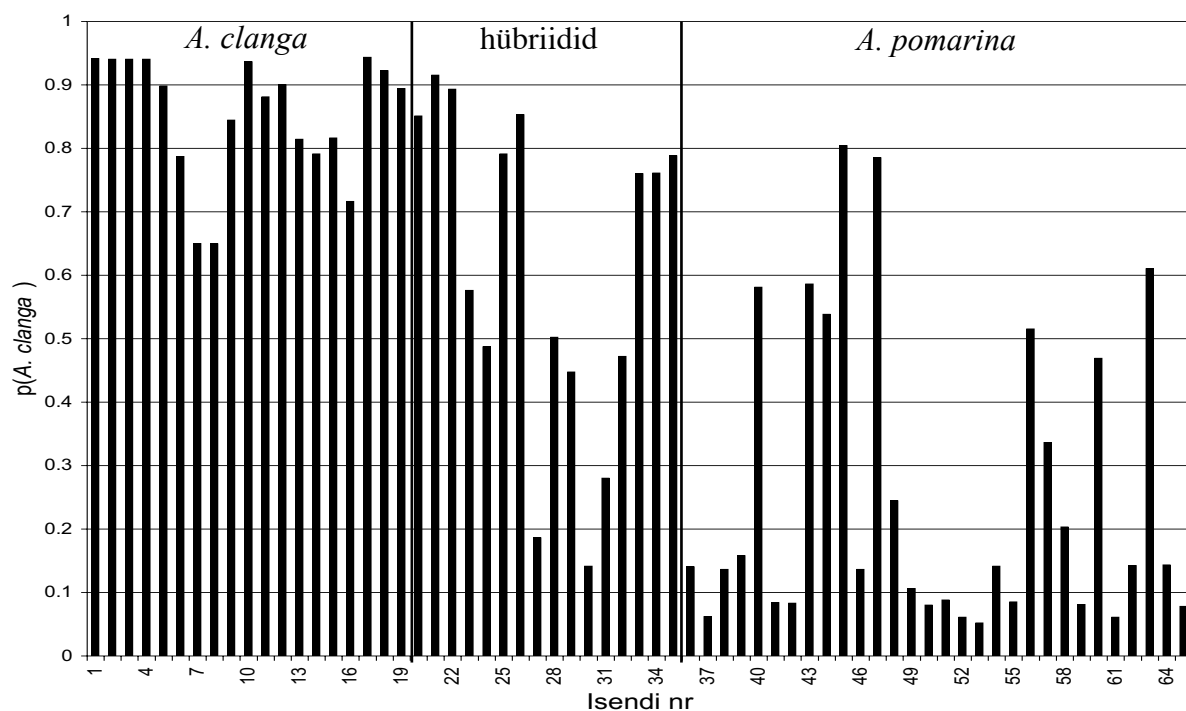
Joonis 5. LDH genotüüpide jaotus konnakotkastel.

3.2. Andmeanalüüs

Analüüsi tulemusena saadi iga isendi kohta tõenäosus $p(i)$, millega ta kuulub kummassegi arvutisimulatsioonis saadud populatsiooni (klastrisse, vt lisa 3 ja joon 7). Selle järgi, millise morfoloogiaga isendid kummaski klastris enamuses olid, nimetasin ma need tinglikult suur- ja väike-konnakotka populatsioonideks. Kõik suur-konnakotkad kuulusid suurema tõenäosusega ühte klastrisse ($p=0,649-0,943$). Vaid kolm isendit olid alla 75% tõenäosusega suur-konnakotkad, neist ühe isendi mtDNA on teadmata (võib mõjutada tulemust). Teised kaks pärinesid pesapaigast, mida hiljem asustas segapaar, kuid ilmselt on tegemist juhusliku kokkulangevusega. Hübriidid jagunesid kolmeks: pooled (kaheksa isendit) paigutusid vähemalt 76% tõenäosusega suur-konnakotkaste juurde, viis isendit ei kuulunud õieti kumbagi klastrisse ($p>0,6$) ja kolm isendit olid pigem väike-konnakotkad ($p>0,72$). Neist kolmest üks oli mtDNA järgi väike-konnakotkas (kõik ülejäänud hübriidid kannavad suur-konnakotka mtDNA-d: Väli 2002, 2004) ja kahe mtDNA on teadmata. Väike-konnakotkad moodustasid samuti kolm rühma. Kaks isendit määras programm suur-konnakotkasteks (mõlema mtDNA on teadmata). Kuus isendit ei langenud kumbagi klastrisse ($p>0,6$), neist ühel on mtDNA suur-konnakotka haplotüüp ja ühe mtDNA haplotüüp pole teada. Ülejäänud väike-konnakotkatest eristus veidi üks isend ($p=0,66$), kelle mtDNA pole teada. Teine suur-konnakotka mitokondriaalse haplotüübiga väike-konnakotkas ei eristunud oma (arvatavate) liigikaaslaste põhihulgast. Andmete graafikule kandmisel moodustusid üsna hästi eristatavad rühmad (joon 6).

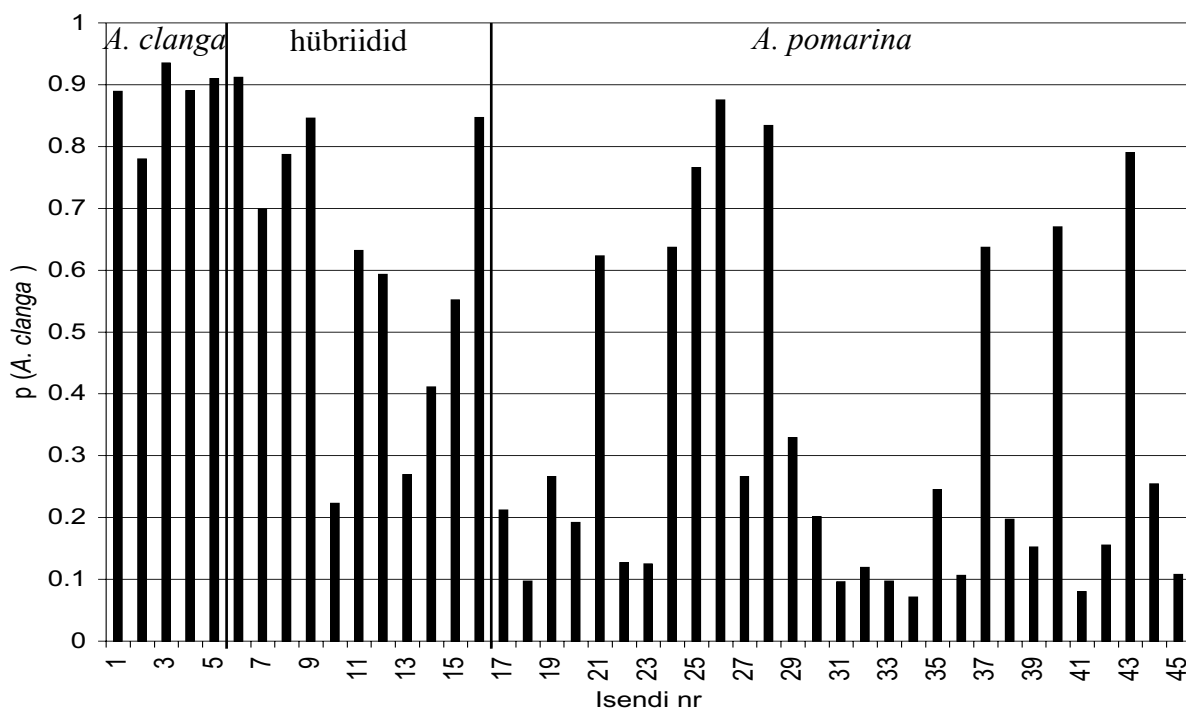


Joonis 6. Analüüsitud isendite suur- või väike-konnakotka populatsiooni kuulumise tõenäosused.



Joonis 7. Analüüsitud isendite suur-konnakotka populatsiooni kuulumise tõenäosused.

Kui analüüsi võeti igalt pesitsusterritooriumilt üksainus isend (viis suur-konnakotkast, 11 hübriidi ja 29 väike-konnakotkast), siis tulemused oluliselt ei muutunud. Hübriidide eristamisvõime (ja sellest tulenevalt ka hübriidide jaotus graafikul) jäi samaks. Üks väike-konnakotkas (mtDNA pole teada) ja üks tagasiristand, kes eelmisel analüüsil said suur- ja väike-konnakotkaste vahepealseid väärtusi määrati nüüd suur-konnakotkasteks (joon 8).



Joonis 8. Isendite suur-konnakotka populatsiooni kuulumise tõenäosused, kui analüüsi võeti igalt pesitsusterritooriumilt üksainus isend.

Ehkki andmete puudulikkuse tõttu pole võimalik hübriide ja tagasiristandeid suur- ja väike-konnakotkastest eristada, tekkisid siiski kahtlused mõnede isendite päritolu suhtes (võimalikud hübriidid või tagasiristandid). Üks suur-konnakotkas (hiljem pesitses samal territooriumil segapaar), kelle suur-konnakotka populatsiooni kuulumise tõenäosuseks saadi kõigest 64,9% eristus teistest suur-konnakotkastest ka peamiselt morfoloogiliste tunnustega tehtud analüüsil (Saag 2004). Mainitud analüüsil sattus see isend *maximum parsimony* (suurima säästuga) kladogrammil hübriidide hulka. Sarnaselt paigutus ka üks väike-konnakotkas, kelle skooriks praegusel analüüsil jäi 48/52%. Kladogrammil ei langenud ta küll hübriidide hulka, kuid ei kuulunud ühte klaadi ka ühegi teise väike-konnakotkaga, jäädes hübriidide ja oma liigikaaslaste klaadi vahele. Üks tagasiristand ja üks väike konnakotkas, kes said vahepealseid väärtusi (alla 60% tõenäosusega kummaski populatsioonis) olid väga tihedalt seotud ka kladogrammidel. Osal säästupuudest oli nendega seotud veel üks väike-konnakotkas, kes käesoleval analüüsil kumbagi populatsiooni ei kuulunud. Kõik need isendid (üks suur- ja kolm väike-konnakotkast) võivad olla tagasiristandid.

4. Arutelu

Traditsiooniliselt väidetakse, et hübriidiseerumise uuringutes tuleb kindlasti kasutada ka liikide levilate allopatrilistest osadest pärit isendeid. Sellised isendid peaksid eeldatavasti olema “tõupuhtad” st liigile algupäraselt omase ja hübriidiseerumisega kaasnevast geenisiirdest mõjutamata genotüübiga. Paraku ei pruugi see väike-konnakotkaste puhul võimalik olla, sest segapaare on leitud peaagu üle kogu levila (Helbig *et al.* 2005b). Ka on hiljuti leitud, et allopatrilistest levila osadest pärit isenditelt saadav informatsioon ei mõjuta oluliselt hübriidide tuvastamist (Väha ja Primmer 2006). Pseudoreplikatsioonide vältimiseks ei soovitata ühelt pesitsusterritooriumilt analüüsi võtta mitut isendit. Antud juhul ei ole võimalik kindlalt väita et ühelt ja samalt pesitsusterritooriumilt pärit, kuid eri aastatel sündinud linnud on üksteise õed ning vennad. Kotkaste eluiga on küll pikk ja nad on tihti väga pesapaiga- ja paarilisetruud, kuid mõningane lindude vahetumine siiski toimub (tõestuseks nii puhta kui ka segapaari pesitsemine eri aastatel ühel territooriumil). Veelgi enam, ühel aastal ühelt pesapaigalt püütud kahe poja ja ühe vanalinnu genotüübid olid kõik erinevad, mis lubab neid iseseisvate vaatlustena võtta.

Uuritud lookuste genotüübisageduste graafikutelt torkab silma mitu huvitavat detaili: esiteks on kõigis lookustes hübriidide heterosügootsus vähemalt 50%. See on loogiline ja ootuspärane — vastab Mendeli seadustele. Teiseks võib oletada väike-konnakotka genotüübisageduste vastavust Hardy-Weinbergi tasakaalule. Viies lookuses see ongi nii, LDH puhul võib tegu olla valimiveaga (lookuste 1.6, 7.1 ja 8.4 valimid on ikkagi ligi 50% suuremad). “AA” homosügootide puudumist väike-konnakotkal on raske seletada teisiti kui valimiveaga, sest vastasel juhul ei saa heterosügootsed väike-konnakotkad pärineda mujalt kui hübriidide tagasiristumisest. Aga suur-konnakotkast 20 korda arvukamal (Väli 2004) väike-konnakotkal ei saa teise põlvkonna hübriidide (AB genotüüp) osakaal 15% ulatuda sel põhjusel, et esimese põlvkonna hübriidide osakaal oleks isegi juhul, kui kõik suur-konnakotkad moodustaksid segapaarid 5% (konnakotkastel lennuvõimestub harilikult üks poeg pesitsuse kohta). Ka enam kui poolte suur-konnakotkaste heterosügootne genotüüp LDH lookuses “BB” homosügootide puudumise juures viitab valimiveale: PP homosügootid on lihtsalt leidmata. Kuid sama põhjust 1.6 lookuses on raskem uskuda: valim on kolm korda suurem. Lõputöös põhjendasin suur-konnakotka “BB” homosügootide puudumist fibrinogeeni lookuses samuti valimiveaga, kuid nüüd on see vähem usutav, sest valim kasvas üle kolme korra. Kuid kui tegemist pole valimiveaga, siis ei saa heterosügootsed suur-konnakotkad pärineda mujalt kui hübriidide tagasiristumisest, mille jaoks 16% suur-konnakotkastest on suur hulk. Samas tagasiristumised kindlasti toimuvad, sest muidu ei saaks esineda suur-konnakotka mtDNA haplotüübiga väike-konnakotkaid (Väli ja Lõhmus 2004, Helbig *et al.* 2005b). Valgevenes on hübriidse fenotüübiga isendeid pesitemas ka kohatud (Dombrovski 2002).

Esmapilgul näivad konnakotkad esindavat tüüpilist hübriidiseerumise juhtu, mis toimub haruldase ja tavalise liigi esindajate vahel (Wirtz 1999, Randler 2002). Nagu juba mainitud, toimub ristumine peamiselt suur-konnakotka emalindude ja väike-konnakotka isalindude vahel. Ka see on tüüpiline, sest on arvatud, et hübriidiseerumine toimub suuresti tänu haruldase liigi paariliseta jäänud emalindudele (Wirtz 1999). Ebatüüpiliseks muudab olukorra sagedus, millega ristumine toimub. Ü. Väli (2004) on välja pakkunud täiendava hüpoteesi, miks konnakotkaste vahel ristumine toimub. Igas röövlinnupopulatsioonis on paariliseta (ja tihti ka pesitsusterritooriumita) isalinde. Kuna kullistel on tavaline nn pööratud suguline dimorfism (emalinnud on isastest suuremad) ja on näidatud, et suuremaksvulised emalinnud on edukamad sigijad (Lõhmus ja Väli 2004), siis võib suurekasvuline suur-konnakotka emalind väiksekasvulise väike-konnakotka isalinnu jaoks olla väga atraktiivne. Selle teooria vastu räägib jällegi hübriidiseerumise sagedus. Tekib küsimus: kuhu on sel juhul kadunud suur-konnakotka isalinnud? Võimalik muidugi, et suur-konnakotka emalindude, kui partnerivalikus aktiivsema osapoole (Wirtz 1999) jaoks on väike-konnakotka isalinnud samuti tugevaks stiimuliks, kuid seda pole seni tõestatud (Väli 2004). Hübriidiseerumisega kohastumist on näidatud kärbsenäppidel (Veen *et al.* 2001).

Veel üks vastuolu ilmneb, kui püüda hinnata hübriidiseerumisest tuleneva geenisiirde suunda. Nagu ka A. J. Helbig jt (2005b) märgivad, on ootuspärane (nii sugulisest dimorfismist kui ka esinemissagedusest tulenevalt), et hübriidsed emalinnud valivad paariliseks pigem väike-konnakotka kui suur-konnakotka isalinnu. Hübriidsete emalindude viljakus on ilmselt mõnevõrra kahanenud (muidu oleks suur-konnakotka mtDNA haplotüübiga väike-konnakotkaid rohkem teada), olles kooskõlas Haldane'i reegluga, mille kohaselt heterogameetse soo (lindudel emased) viljakus langeb hübriidiidel rohkem. Kuna hübriidsed isalinnud on väike konnakotka emalindudega ühesuurused, või koguni suuremad, peaksid nad eeldatavasti paare moodustama suur-konnakotka emalindudega. Seega oleks ootuspärane, et geenisiire toimub peamiselt väike-konnakotka populatsioonist suur-konnakotka populatsiooni. Tõsi küll, kuna suur-konnakotkas on tunduvalt haruldasem, ei leia kõik hübriidsed isalinnud endale tõenäoliselt paarilist ja geenisiire peaks enam-vähem tasakaalus olema. Vaadates nii tuumageenide genotüübisagedusi ühekaupa kui ka analüüsi tulemusi tekib mulje, et otse vastupidi on geenisiire suunatud suur-konnakotkastelt väike-konnakotkastele. Kuidas muidu seletada "BB" homosügootide puudumist suur-konnakotkaste seas tervelt kolmes lookuses viiest. Samas on kõigis kolmes lookuses "BB" genotüüp väike-konnakotkaste seas tavalisim (joon 1; 2 ja 5). Kui väljenduda lihtsustatult, siis määrati analüüsil kõik suur-konnakotkad (enam-vähem) kindlalt suur-konnakotkasteks. Väike-konnakotkad said ka suur-konnakotkale omaseid ja vahepealseid väärtusi (joon 6). Need nõ valesi klasterdunud isendid võivad olla tagasiristandid või teise põlvkonna hübriidid, ehkki üks kahest seniavastatud tõenäolisest tagasiristandist (Väli ja Lõhmus 2004) oli nii fibrinogeeni kui LDH lookuse suhtes BB homosügoot (tüüpiline väike-konnakotkale) ja teine oli "BB" homosügoot 1.6, 7,1 ja 8.4 lookustes (suur-konnakotkastele on iseloomulik "AA" genotüüp).

Lähedaste liikide puhul tuleb ka arvestada, et “liinid” ei pruugi olla lõpuni sorteerunud. Sellisel juhul on hübriidide, aga eriti teise põlvkonna hübriidide ja tagasiristandite väljaselgitamine tunduvalt keerukam. Hübriidse genotüübiga isendid võivad jääda liigisisest varieeruvusest tingitud “müra” tõttu tuvastamata. Samuti võib “puhtatõulisi” isendeid ekslikult hübriidideks pidada, kuna nad on ebatüüpilise genotüübiga. Liinide lõpuni sorteerumatus osaliselt selgitaks vastuolulisi mustreid genotüübisagedustes ja isendite klasterdumises.

Hübriidiseerumise sagedus on enam-vähem teada: segapaare moodustavad kuni pooled suur-konnakotkastest. Tagasiristumise sageduse ja hübriidiseerumise mõju hindamine on keerukam. Esiteks on andmeid ikka veel vähe ja teiseks ei pruugi geneetilised liinid lõpuni sorteerunud olla. Mitokondriaalsete markerite abil on seni leitud seitse väike-konnakotka ja hübriidi (tagasi)ristandit (Helbig *et al.* 2004, Väli ja Lõhmus 2004). Kuna uuritud on 200 väike-konnakotkast (N=61 Helbig *et al.* 2004, N=139 Väli ja Lõhmus 2004), siis tagasiristumise sageduseks tuleb 3,5%. Arvestades nii Helbig’i jt (2004) kui ka selles töös tuumamarkeritega saadud tulemusi, võib tegelik tagasiristumise sagedus olla suurem. Suur-konnakotkaste seast pole ühtegi tagasiristandit tõestada õnnestunud ja see on ka raskem kui väike-konnakotkaste puhul (on ju enamus hübriide suur-konnakotka mtDNA-ga). Valgevenest (nagu juba mainitud) on siiski teada juhused, kus suur-konnakotkaga on koos-pesitsenud tõenäoline hübriid (Dombrowski 2002). Seega, kui arvestada suur-konnakotka (vähemalt 10 korda) madalamat arvukust ja segapaaride moodustumise sagedust, pole võimatu, et fibrinogeeni lookuse 16% heterosügootide (reaalselt kolm isendit 19-st) “BB” homosügootide puudumise juures (suur-konnakotkaste seas) on tõepoolest tagasiristandid. Seda enam, et üks neist on eespool mainitud ebatüüpilise fenotüübiga isend.

Kahtlemata kerkib küsimus, kas nii sagedase ristumise korral on konnakotkaid mõttekas käsitleda eraldi liikidena? Nn klassikalisteks liikideks ei saa neid sagedase ristumise tõttu pidada. Lõhmus ja Väli (2001 ning Väli 2004) on soovitanud suur- ja väike-konnakotkale poolligi staatust. Seda lähenemist tuleks toetada, sest nagu mtDNA andmed näitavad, eksisteerib siiski teatav ristumisbarjäär, mis ei võimalda konnakotkaid alamliikidena käsitleda, ka morfoloogilistes tunnustes on kindlad erinevused (Forsman 1999, Väli ja Lõhmus 2004).

Omaette probleem on ka hübriidide käsitlemine looduskaitsealises aspektist. Kas kaitsta neid võrdselt haruldasema või tavalisema liigiga, või jätta nad hoopiski kaitseta, kui “ebaloomulik” nähtus? On soovitatud hübriide käsitleda haruldasema liigi esindajatena või vähemalt nendega võrdselt (Haig *et al.* 2004). Eestis on nii suur- kui ka väike-konnakotkas I kaitsekategooria (kõige rangem) kaitsealused liigid ning segapaaride pesitsusterritooriumidel kehtivad samad piirangud mis suur-konnakotka territooriumidel.

Kokkuvõtvalt tuleb tõdeda, et üks mitokondriaalne ja viis tuumageeni lookust on ilmselt vähe, et hübriide tuvastada. J.-P. Vähä ja C. R. Primmer'i (2006) järgi oleks esimese põlvkonna hübriidide tuvastamiseks vaja 12-24 lookust ja tagasiristandite eristamiseks "puhtatõulistest" isenditest vähemalt 48 lookust. Vähä ja Primmer kasutasid oma töös mikrosatelliite, intronite järjestusi kasutades on see võimalik ka väiksema lookuste arvuga (Munoz-Pomer Fuentes 2005), kuid orienteeruvalt 10 liike eristavat markerit oleks siiski tarvis. Seega tuleb tõdeda, et vaatamata suurtele pingutustele on olukord siiski veel ebaselge ja uuringuid tuleks jätkata.

5. Kokkuvõte

Suur- (*Aquila clanga*, Pallas 1811) ja väike-konnakotkas (*A. pomarina*, Brehm 1831) on morfoloogiliselt raskestieristatavad liigid (Forsman 1999). Nende määramist ja taksonoomilist määratlemist raskendab veelgi asjaolu, et nad ristuvad (Lõhmus ja Väli 2001). Kuivõrd ristumine võib kujutada täiendavat ohtu suur-konnakotkale, kes kuulub ohustatud liikide hulka (Väli ja Lõhmus 2000), on oluline välja selgitada ristumise sagedus ja ristumise tagajärjed liikidele.

Töös kasutati kuut DNA markerit: üht mtDNA lookust ja viit tuumalookuse intronit. Genotüpiseeriti 19 suur-konnakotkast, 30 väike-konnakotkast ja 16 hübriidset isendit. Hübriidide staatus määrati morfoloogia põhjal. Populatsioonigeneetilisteks analüüsideks kasutati mudelipõhist klasterdusmeetodit (ja programmi Structure).

Üldjoontes õnnestus eristada suur- ja väike-konnakotkad. Morfoloogia põhjal hübriidideks määratud isendeid suur- ega väike konnakotkastest eristada ei õnnestunud, kuid väike-konnakotkaste seast eristus rühm isendeid, kes võivad olla hübriidset päritolu. Väikeste valimite ja kasutatud markerite vähesuse tõttu jäid liikidevahelised suhted siiski segaseks ja kindlasti on vajalik uuringute jätkamine.

6. Summary

Interbreeding of Greater Spotted and Lesser Spotted Eagles (*Aquila clanga* et *A. pomarina*,
Acciptriformes: Accipitridae) – a study using molecular markers

The Greater Spotted (*Aquila clanga* Pallas 1811) and the Lesser Spotted Eagle (*A. pomarina* Brehm 1831) are species which are morphologically difficult to distinguish (Forsman 1999). Their identification and taxonomic determination are even more complicated tasks due to the fact that they interbreed (Lõhmus & Väli 2001). As interbreeding may cause an extra threat for Greater Spotted Eagle, who is an endangered species (Väli & Lõhmus 2000), the hybridization frequency and consequences of hybridization are important items of research.

In this study, six DNA markers were used to separate species: one mitochondrial locus and five nuclear introns. 19 Greater Spotted, 30 Lesser Spotted Eagles and 16 hybrid individuals were genotyped. The hybrid status was determined by morphology. A model-based clustering method (program Structure) was used for population genetics analysis.

In general, it was possible to separate the samples of Greater Spotted and Lesser Spotted Eagles. Specimens determined as hybrids by morphology could not be separated from Greater Spotted and Lesser Spotted Eagles. Still, among Lesser Spotted Eagles there was a group of specimens which was distinguished from others. These birds might be of hybrid ancestry.

The interspecific relationships remained still unclear because of small sample sizes and small number of used markers. Further investigation is recommended.

Tänuavaldused

Tänan oma juhendajaid Ülo Väli ja Urmas Saarmat juhendamise ja igakülgse abi eest. Samuti tänan kõiki teisi, kes mulle selle töö ettevalmistamisel ja valmimisel nõu ja jõuga abiks on olnud. Ülo soovin eraldi tänada veel selle eest, et mul ülepea on olnud võimalik niivõrd huvitava teema kallal töötada.

Kasutatud kirjandus

- Anderson, E. C., Thompson, E. A. 2002. A model based method for identifying hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160: 1217-1229.
- Ankney, C. D., Dennis, D. G., Wishard, L. N., Seeb, J. E. 1986. Low genetic variation between Black Ducks and Mallards. *The Auk* 103: 701-709.
- Barrowclough, G. F., Gutiérrez, R. J. 1990 Genetic variation and differentiation in the Spotted Owl (*Strix occidentalis*). *The Auk* 107: 737-744.
- Bell, D. A. 1996. Genetic Differentiation, Geographic Variation and Hybridisation in Gulls of the *Larus glaucescens* - *occidentalis* Complex. *The Condor* 98: 527-546.
- Bensch, S., Helbig, A. J., Salomon, M., Seibold, I. 2002 a. Amplified fragment length polymorphism analysis identifies hybrids between two subspecies of warblers. *Molecular Ecology* 11: 473-481.
- Bensch, S., Åkesson, S., Irwin, D. E. 2002 b. The use of AFLP to find an informative SNP: genetic differences across a migratory divide in willow warblers. *Molecular Ecology* 11: 2359-2366.
- Bures, S., Nadvorník, P., Sætre, G.-P. 2002. Hybridization and apparent hybridization between meadow pipit (*Anthus pratensis*) and water pipit (*A. spinoletta*). *Hereditas* 136: 254-256.
- Dombrovski, V. C. 2002. Hybridization of lesser and greater spotted eagles (*Aquila pomarina* et *A. clanga*) in Belarus: rule or exception? *Subbuteo* 5: 23-31.
- Farquhar, C. C. 1998. *Buteo polysoma* and *B. poecilochrus*, the “Red-backed Buzzards” of South America, are conspecific. *The Condor* 100: 27-43.
- Forsman, D. 1999. The Raptors of Europe and the Middle East. A Handbook of Field Identification. T & AD Poyser, London, pp. 317-341.
- Grant, P. R., Grant, B. R. 1992. Hybridization of Bird Species. *Science*, 256: 193-197.
- Haig, S. M., Mullins, T. D., Forsman, E. D., Trail, P. W., Wennerberg, L. 2004. Genetic Identification of Spotted Owl, Barred Owls, and Their Hybrids: Legal Implications of Hybrid Identity. *Conservation Biology* Vol 18, 5: 1347-1357.

- Hansson, M. C., Bensch, S., Brännström, O. 2000. Range expansion and the possibility of an emerging contact zone between two subspecies of Chiffchaff *Phylloscopus collybita ssp.* Journal of Avian Biology 31: 548-558.
- Haring, E., Kruckenhauser, L., Gamauf, A., Riesing, M. J., Pinsker, W. 2001. The Complete Sequence of the Mitochondrial Genome of *Buteo buteo* (Aves, Accipitridae) Indicates an Early Split in the Phylogeny of Raptors. Molecular Biology and Evolution 18 (10): 1892-1904.
- Helbig, A. J., Salomon, M., Bensch, S., Seibold, I. 2001. Male-biased gene flow across an avian hybrid zone: evidence from mitochondrial and microsatellite DNA. Journal of Evolutionary Biology 14: 277-287.
- Helbig, A. J., Kocum, A., Seibold, I., Braun, M. J. 2005 a. A multi-gene phylogeny of aquiline eagles (Aves: Accipitriformes) reveals extensive paraphyly at the genus level. Molecular Phylogenetics and Evolution 35: 147-164.
- Helbig, A.J., Seibold, I., Kocum, A., Liebers, D., Irwin, J., Bergmanis, U., Meyburg, B.-U., Scheller, W., Stubbe, M., Bensch, S. 2005 b. Genetic differentiation and hybridization between Greater and Lesser Spotted Eagles (Accipitriformes: *Aquila clanga*, *A. pomarina*). Journal of Ornithology 146: 226-234.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics 17: 754-755.
- Lerner, H. R. L., Mindell, D. P. 2005. Phylogeny of eagles, Old World vultures, and other Acciptridae based on nuclear and mitochondrial DNA. Molecular Phylogenetics and Evolution 37: 327-346.
- Lifjeld, J. T., Bjørnstad, G., Steen, O. F., Nesje, M. 2002. Reduced genetic variation in Norwegian Peregrine Falcons *Falco peregrinus* indicated by minisatellite DNA fingerprinting. Ibis 144: E19-E26.
- Lindberg, P., Nesje, M. 2000. Lost falconers birds and hybrid falcons - do they have an impact on European Peregrine Falcon (*Falco peregrinus*) populations? - a case study of lost falconers birds breeding in Sweden. World Conference on birds of prey & owls, Raptor 2000, Eilat, Israel. pp 107.

- Lõhmus, A., Väli, Ü. 2001. Interbreeding of the Greater *Aquila clanga* and Lesser Spotted Eagle *A. pomarina*. *Acta Ornithoecologica* 4: 377-384.
- Lõhmus, A., Väli, Ü. 2004. The effects of habitat quality and female size on the productivity of the Lesser Spotted Eagle *Aquila pomarina* in the light of the alternative prey hypothesis. *Journal of Avian Biology* 35 (5): 455-464.
- Mank, J. E., Carlson, J. E., Brittingham, M. C. 2004. A century of hybridization: Decreasing genetic distance between American black ducks and mallards. *Conservation Genetics* 5 (3): 395-403.
- Martin, R. F., Selander, R. K. 1975. Morphological and biochemical evidence of hybridization between cave and barn swallows. *Condor* 77(3): 362-364.
- Martínez-Cruz, B., David, V. A., Godoy, J. A., Negro, J. J., O'brien, S. J., Johnson, W. E. 2002. Eighteen polymorphic microsatellite markers for the highly endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) and related species. *Molecular Ecology Notes* 2: 323-326.
- Martinez-Cruz, B., Godoy, J. A., Negro, J. J. 2004. Population genetics after fragmentation: the case of the endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*). *Molecular Ecology* 13: 2243-2255.
- Meyburg, B.-U., Haraszthy, L., Strazds, M., Schäffer, N. 2001. European Species Action Plans for Greater and Lesser Spotted Eagles. Schäffer, N., Gallo-orsi, U. (eds.) European Union action plans for eight priority bird species. European Commission, Luxembourg.
- Munoz-Pomer Fuentes, V. 2005. Genetica de poblaciones e hibridacion de la malvasia cabeciblanca, *Oxyura leucocephala*, y la malvasia canela, *O. jamaicensis*. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
- Negro, J. J., Hiraldo, F. 1994. Lack of allozyme variation in the Spanish Imperial Eagle *Aquila adalberti*. *Ibis* 136: 87-90.
- Negro J. J., Torres M. J. 1999. Genetic variability and differentiation of two bearded vulture *Gypaetus barbatus* populations and implications for reintroduction projects. *Biological conservation* 87: 249-254.

- Nesje, M., Røed, K. H., Lifjeld, J. T., Lindberg, P., Steen, O. F. 2000 a. Genetic relationships in the peregrine falcon (*Falco peregrinus*) analysed by microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* 9: 53-60.
- Nesje, M., Røed, K. H., Bell, D. A., Lindberg, P., Lifjeld, J. T. 2000 b. Microsatellite analysis of population structure and genetic variability in peregrine falcons (*Falco peregrinus*). *Animal Conservation* 3: 267-275.
- Nichols, R. A., Bruford, M. W., Groombridge, J. J. 2001. Sustaining genetic variation in a small population: evidence from the Mauritius kestrel. *Molecular Ecology* 10: 593-602.
- Pacheco, N. M., Congdon, B. C., Friesen, V. L. 2002. The utility of nuclear introns for investigating hybridization and genetic introgression: a case study involving *Brachyramphus* murrelets. *Conservation Genetics* 3: 175-182.
- Primmer, C. R., Borge, T., Lindell, J., Sætre, G.-P. 2002. Single-nucleotide polymorphism characterization in species with limited available sequence information: high nucleotide diversity revealed in the avian genome. *Molecular Ecology* 11: 603-612.
- Pritchard, K. P., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. Inference of population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155: 945-959.
- Randler, C. 2002. Avian hybridization, mixed pairing and female choice. *Animal Behaviour* 63: 103-119.
- Riesing, M., J., Kruckenbhauser, L., Gamauf, A., Haring, E. 2003. Molecular phylogeny of the genus *Buteo* (Aves: Accipitridae) based on mitochondrial marker sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 328-342.
- Rohwer, S., Bermingham, E. Wood, C. 2001. Plumage and mitochondrial DNA haplotype variation across a moving hybrid zone. *Evolution* 55 (2): 405-422.
- Saag, P. 2003. Isosüümide kasutamine lindude süstemaatikas ja populatsioonigeneetikas. Harjutustöö.
- Saag, P. 2004. Suur- ja väike-konnakotka (*Aquila clanga et pomarina*, O. Falconiformes, Fam. Accipitridae) eristamine molekulaarsete markerite abil. Bakalaureusetöö.

- Schreiber, A., Weitzel, T. 1995. Biochemical Systematics of Sea Eagles (*Genus Haliaeetus* Savigny 1809), with a Note on Allozyme Differentiation Between Black and Red Kites (Genus *Milvus* L. 1758). *Biochemical Systematics and Ecology* Vol. 23, 3: 235-244.
- Sibley, C. G., Monroe, B. L. 1990. *Distribution and Taxonomy of Birds of the World*. Yale University Press, New Haven & London.
- Solberg, E., J., Ringsby, T., H., Altwegg, A., Sæther, B.-E. 2000. Fertile House Sparrow X Tree Sparrow (*Passer domesticus* X *Passer montanus*) hybrids? *Journal für Ornithologie* 141: 102-104.
- Suchentrunk, F., Haller, H., Ratti, P. 1999. Gene pool variability of a Golden Eagle (*Aquila chrysaetos*) population from the Swiss Alps. *Biological Conservation* Vol. 90, 2: 151-155.
- Swofford, D. L. 1998. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Sætre, G.-P., Král, M., Bureš, S., Ims, R. A. 1999. Dynamics of a clinal hybrid zone and comparison with island hybrid zones of flycatchers (*Ficedula hypoleuca* and *F. albicollis*). *Journal of Zoology* (?) 247: 53-64.
- Thode, A. B., Maltbie, M., Hansen, L. A., Green, L. D., Longmire, J. L. 2002. Microsatellite markers for the Mexican spotted owl (*Strix occidentalis lucida*). *Molecular Ecology Notes* 2: 446-448.
- Veen, T., Borge, T., Griffith, S., C., Sætre, G.-P., Bureš, S., Gustafsson, L., Sheldon, B., C. 2001. Hybridization and adaptive mate choice in flycatchers. *Nature* 411: 45-50.
- Vähä, J.-P., Primmer, C. R. 2006. Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology* 15: 63-72.
- Väli, Ü., Lõhmus, A. 2000. Suur-konnakotkas ja tema kaitse Eestis. *Hirundo Supplementum* 3: 1-50.
- Väli, Ü. 2002. Mitochondrial pseudo-control region in old world eagles (*genus Aquila*). *Molecular Ecology* 11: 2189-2194.

- Väli, Ü. 2004. The Greater Spotted Eagle *Aquila clanga* and the Lesser Spotted Eagle *A. pomarina*: taxonomy, phylogeography and ecology. Dissertationes Biologicae Universitatis Tartuensis, 86.
- Väli, Ü., Treinys, R., Poirazidis, K. 2004. Genetic structure of Greater *Aquila clanga* and Lesser Spotted Eagle *A. pomarina* populations: implications for phylogeography and conservation. Chancellor, R. D. & Meyburg, B.-U. (eds.) *Raptors Worldwide*: 473-482. WWGBP/MME.
- Väli, Ü., Lõhmus, A. 2004. Nestling characteristics and identification of the Lesser Spotted Eagle *Aquila pomarina*, Greater Spotted Eagle *A. clanga* and their hybrids. *Journal of Ornithology* 145 (3): 256-263.
- Wink, M., Heidrich, P., Fentzloff, C. 1996. A mtDNA Phylogeny of Sea Eagles (*genus Haliaeetus*) Based on Nucleotide Sequences of the Cytochrome b-gene. *Biochemical Systematics and Ecology* Vol. 24, 7/8: 783-791.
- Wirtz, P. 1999. Motherspecies-father species: unidirectional hybridization in animals with choice. *Animal Behaviour* 58: 1-12.

Lisad

Lisa 1

Analüüsis kasutatud andmetabel

Isendi nr	Territoorium	Aasta	Liik	Lookus					
				mtDNA	FIB7	LDH	prim 1.6	prim 7.1	prim 8.4
1	1	1999	<i>A. clanga</i>	C	AA		AA	AA	AA
2	1	2000	<i>A. clanga</i>	C	AA		AA	AA	AA
3	1	2001	<i>A. clanga</i>	C	AA		AB	AA	AA
4	1	2002	<i>A. clanga</i>	C	AA		AB	AA	AA
5	1	2003	<i>A. clanga</i>	C	AA	AB	AB	AA	AA
6	2	1997	<i>A. clanga</i>		AA		AB	AB	AB
7	2	1999	<i>A. clanga</i>	C	AB		AB	AB	AB
8	2	2000	<i>A. clanga</i>	C	AB		AB	BB	AB
9	2	2001	<i>A. clanga</i>	C	AA		AB	BB	AB
10	zoo	1998	<i>A. clanga Ad</i>	C	AA		AA	BB	AA
11	3	2002	<i>A. clanga</i>	C	AA	AB		AA	AB
12	3	2003	<i>A. clanga</i>	C	AA	AB	AB	AA	AA
13	3	2004	<i>A. clanga</i>		AA			AA	AB
14	3	2005	<i>A. clanga</i>		AA		AB	AA	AB
15	3	2005	<i>A. clanga</i>		AA		AA	AA	BB
16	3	2005	<i>A. clanga Ad</i>		AB		AA	AA	AB
17	4	2002	<i>A. clanga</i>	C	AA	AA	AA	AA	AB
18	4	2003	<i>A. clanga</i>	C	AA	AA	AA	AA	BB
19	4	2004	<i>A. clanga</i>		AA		AA	AA	AB
20	5	2001	hübriid	C	AA		AB	AB	AB
21	5	2003	hübriid	C	AA		AA	AB	AB
22	5	2005	hübriid		AA		AA	AB	AB
23	2	2002	hübriid	C	AB	AB		AB	BB
24	2	2004	hübriid		AB			BB	AB
25	6	2004	hübriid		AA		AB	AA	AB
26	7	1999	hübriid	C	AA		AB	AA	AB
27	8	2000	hübriid	P			BB	AA	AB
28	9	2002	hübriid	C	AB	BB	AB	AB	AB
29	10	2001	hübriid	C	AB		BB	AB	AB
30	11	2005	hübriid		AB		BB	AB	BB
31	12	2004	hübriid		AB		BB	AB	AB
32	13	2003	hübriid	C	AB		AB	AA	BB
33	14	1999	hübriid	C	AB		AB	BB	AA
34	14	2000	hübriid	C	AB		AB	BB	AA
35	14	2001	hübriid	C	AB		AA	BB	AB

Analüüsis kasutatud andmetabel

Isendi nr	Territoorium	Aasta	Liik	Lookus					
				mtDNA	FIB7	LDH	prim 1.6	prim 7.1	prim 8.4
36	15	2004	<i>A. pomarina</i>		AB		BB	AA	BB
37	16	2003	<i>A. pomarina</i>	P	BB		BB	AB	BB
38	17	2004	<i>A. pomarina</i>		AB		BB	AB	BB
39	18	2002	<i>A. pom.</i> tagasiristand	C	BB	BB		AB	BB
40	19	2002	<i>A. pomarina</i>	P	AB	AB	AB	AA	AA
41	20	2002	<i>A. pomarina</i>	P	BB	BB	AB	AB	BB
42	21	2002	<i>A. pomarina</i>	P	BB	BB	AB	AB	BB
43	22	2001	<i>A. pomarina</i>	P	AA			AA	AB
44	23	2002	<i>A. pom.</i> tagasiristand	C	AA		BB	BB	BB
45	24	2005	<i>A. pomarina</i>		AA		AA	BB	BB
46	10	2005	<i>A. pomarina</i>		AB		BB	AB	BB
47	25	2005	<i>A. pomarina</i>		AA		AB	AB	AB
48	26	2002	<i>A. pomarina</i>	P	AB	BB	AA	AA	BB
49	27	2003	<i>A. pomarina</i>	P	BB		AB	BB	BB
50	28	2002	<i>A. pomarina</i>	P	BB	BB		AA	
51	29	2002	<i>A. pomarina</i>	P	BB	BB	BB	AB	AB
52	30	2003	<i>A. pomarina</i>	P	BB		BB	AB	BB
53	31	2002	<i>A. pomarina</i>	P	BB	BB	BB	AA	BB
54	32	2002	<i>A. pomarina</i>	P	AB	BB	AB	AB	BB
55	33	2002	<i>A. pomarina</i>	P	BB	BB	AB	AA	BB
56	34	2002	<i>A. pomarina</i>	P	AA	AB	AB	AA	BB
57	34	2004	<i>A. pomarina</i>		AA		BB	AB	BB
58	35	1998	<i>A. pomarina</i>	P	BB	BB		AA	AA
59	36	2002	<i>A. pomarina</i>	P	AB	BB	BB	AB	BB
60	37	2002	<i>A. pomarina</i>	P	AB	AB	AA	BB	BB
61	38	2003	<i>A. pomarina</i>	P	BB		BB	AA	BB
62	39	2002	<i>A. pomarina</i>	P	BB	BB	AB	AA	AB
63	40	2005	<i>A. pomarina</i>		AA			BB	BB
64	41	2002	<i>A. pomarina</i>	P	AA	BB	BB	AA	BB
65	42	2002	<i>A. pomarina</i>	P	BB	BB			

Kodeeritud tunnuste tabel

1 tähendab "A" ja 2 "B" alleeli, -9 andmete puudumist

Isendi nr	Lookus					
	mtDNA	FIB7	LDH	prim 1.6	prim 7.1	prim 8.4
1	1	1	-9	1	1	1
1	-9	1	-9	1	1	1
2	1	1	-9	1	1	1
2	-9	1	-9	1	1	1
3	1	1	-9	1	1	1
3	-9	1	-9	1	1	1
4	1	1	-9	1	1	1
4	-9	1	-9	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1
5	-9	1	2	2	1	1
6	-9	1	-9	1	1	1
6	-9	1	-9	2	2	2
7	1	1	-9	1	1	1
7	-9	2	-9	2	2	2
8	1	1	-9	1	2	1
8	-9	2	-9	2	2	2
9	1	1	-9	1	2	1
9	-9	1	-9	2	2	2
10	1	1	-9	1	2	1
10	-9	1	-9	1	2	1
11	1	1	1	-9	1	1
11	-9	1	2	-9	1	2
12	1	1	1	1	1	1
12	-9	1	2	2	1	1
13	-9	1	-9	-9	1	1
13	-9	1	-9	-9	1	2
14	-9	1	-9	1	1	1
14	-9	1	-9	2	1	2
15	-9	1	-9	1	1	2
15	-9	1	-9	1	1	2
16	-9	1	-9	1	1	1
16	-9	2	-9	1	1	2
17	1	1	1	1	1	1
17	-9	1	1	1	1	2
18	1	1	1	1	1	2
18	-9	1	1	1	1	2
19	-9	1	-9	1	1	1
19	-9	1	-9	1	1	2
20	1	1	-9	1	1	1
20	-9	1	-9	2	2	2

Kodeeritud tunnuste tabel

1 tähendab "A" ja 2 "B" alleeli, -9 andmete puudumist

Isendi nr	Lookus					
	mtDNA	FIB7	LDH	prim 1.6	prim 7.1	prim 8.4
21	1	1	-9	1	1	1
21	-9	1	-9	1	2	2
22	-9	1	-9	1	1	1
22	-9	1	-9	1	2	2
23	1	1	1	-9	1	2
23	-9	2	2	-9	2	2
24	-9	1	-9	-9	2	1
24	-9	2	-9	-9	2	2
25	-9	1	-9	1	1	1
25	-9	1	-9	2	1	2
26	1	1	-9	1	1	1
26	-9	1	-9	2	1	2
27	2	-9	-9	2	1	1
27	-9	-9	-9	2	1	2
28	1	1	2	1	1	1
28	-9	2	2	2	2	2
29	1	1	-9	2	1	1
29	-9	2	-9	2	2	2
30	-9	1	-9	2	1	2
30	-9	2	-9	2	2	2
31	-9	1	-9	2	1	1
31	-9	2	-9	2	2	2
32	1	1	-9	1	1	2
32	-9	2	-9	2	1	2
33	1	1	-9	1	2	1
33	-9	2	-9	2	2	1
34	1	1	-9	1	2	1
34	-9	2	-9	2	2	1
35	1	1	-9	1	2	1
35	-9	2	-9	1	2	2
36	-9	1	-9	2	1	2
36	-9	2	-9	2	1	2
37	2	2	-9	2	1	2
37	-9	2	-9	2	2	2
38	-9	1	-9	2	1	2
38	-9	2	-9	2	2	2
39	1	2	2	-9	1	2
39	-9	2	2	-9	1	2
40	2	1	1	1	1	1
40	-9	2	2	2	1	1

Kodeeritud tunnuste tabel

1 tähendab "A" ja 2 "B" alleeli, -9 andmete puudumist

Isendi nr	Lookus					
	mtDNA	FIB7	LDH	prim 1.6	prim 7.1	prim 8.4
41	2	2	2	1	1	2
41	-9	2	2	2	2	2
42	2	2	2	1	1	2
42	-9	2	2	2	2	2
43	2	1	-9	-9	1	1
43	-9	1	-9	-9	1	2
44	1	1	-9	2	2	2
44	-9	1	-9	2	2	2
45	-9	1	-9	1	2	2
45	-9	1	-9	1	2	2
46	-9	1	-9	2	1	2
46	-9	2	-9	2	2	2
47	-9	1	-9	1	1	1
47	-9	1	-9	2	2	2
48	2	1	2	1	1	2
48	-9	2	2	1	1	2
49	2	2	-9	1	2	2
49	-9	2	-9	2	2	2
50	2	2	2	-9	1	-9
50	-9	2	2	-9	1	-9
51	2	2	2	2	1	1
51	-9	2	2	2	2	2
52	2	2	-9	2	1	2
52	-9	2	-9	2	2	2
53	2	2	2	2	1	2
53	-9	2	2	2	1	2
54	2	1	2	1	1	2
54	-9	2	2	2	2	2
55	2	2	2	1	1	2
55	-9	2	2	2	1	2
56	2	1	1	1	1	2
56	-9	1	2	2	1	2
57	-9	1	-9	2	1	2
57	-9	1	-9	2	2	2
58	2	2	2	-9	1	1
58	-9	2	2	-9	1	1
59	2	1	2	2	1	2
59	-9	2	2	2	2	2
60	2	1	1	1	2	2
60	-9	2	2	1	2	2

Kodeeritud tunnuste tabel

1 tähendab "A" ja 2 "B" alleeli, -9 andmete puudumist

Isendi nr	Lookus					
	mtDNA	FIB7	LDH	prim 1.6	prim 7.1	prim 8.4
61	2	2	-9	2	1	2
61	-9	2	-9	2	1	2
62	2	2	2	1	1	1
62	-9	2	2	2	1	2
63	-9	1	-9	-9	2	2
63	-9	1	-9	-9	2	2
64	2	1	2	2	1	2
64	-9	1	2	2	1	2
65	2	2	2	-9	-9	-9
65	-9	2	2	-9	-9	-9

Programmi Structure analüüsi tulemused

Isendi nr	Territoorium	Aasta	Liik	p (A. pomarina)	p (A. clanga)
1	1	1999	<i>A. clanga</i>	0.059	0.941
2	1	2000	<i>A. clanga</i>	0.06	0.94
3	1	2001	<i>A. clanga</i>	0.06	0.94
4	1	2002	<i>A. clanga</i>	0.06	0.94
5	1	2003	<i>A. clanga</i>	0.102	0.898
6	2	1997	<i>A. clanga</i>	0.213	0.787
7	2	1999	<i>A. clanga</i>	0.35	0.65
8	2	2000	<i>A. clanga</i>	0.351	0.649
9	2	2001	<i>A. clanga</i>	0.156	0.844
10	zoo	1998	<i>A. clanga Ad</i>	0.064	0.936
11	3	2002	<i>A. clanga</i>	0.119	0.881
12	3	2003	<i>A. clanga</i>	0.1	0.9
13	3	2004	<i>A. clanga</i>	0.186	0.814
14	3	2005	<i>A. clanga</i>	0.209	0.791
15	3	2005	<i>A. clanga</i>	0.184	0.816
16	3	2005	<i>A. clanga Ad</i>	0.284	0.716
17	4	2002	<i>A. clanga</i>	0.057	0.943
18	4	2003	<i>A. clanga</i>	0.078	0.922
19	4	2004	<i>A. clanga</i>	0.106	0.894
20	5	2001	hübriid	0.149	0.851
21	5	2003	hübriid	0.085	0.915
22	5	2005	hübriid	0.107	0.893
23	2	2002	hübriid	0.424	0.576
24	2	2004	hübriid	0.513	0.487
25	6	2004	hübriid	0.209	0.791
26	7	1999	hübriid	0.147	0.853
27	8	2000	hübriid	0.814	0.186
28	9	2002	hübriid	0.498	0.502
29	10	2001	hübriid	0.553	0.447
30	11	2005	hübriid	0.859	0.141
31	12	2004	hübriid	0.72	0.28
32	13	2003	hübriid	0.528	0.472
33	14	1999	hübriid	0.24	0.76
34	14	2000	hübriid	0.239	0.761
35	14	2001	hübriid	0.212	0.788
36	15	2004	<i>A. pomarina</i>	0.86	0.14
37	16	2003	<i>A. pomarina</i>	0.938	0.062
38	17	2004	<i>A. pomarina</i>	0.864	0.136
39	18	2002	<i>A. pom. tagasiristand</i>	0.842	0.158
40	19	2002	<i>A. pomarina</i>	0.419	0.581
41	20	2002	<i>A. pomarina</i>	0.916	0.084
42	21	2002	<i>A. pomarina</i>	0.917	0.083
43	22	2001	<i>A. pomarina</i>	0.414	0.586
44	23	2002	<i>A. pom. tagasiristand</i>	0.462	0.538
45	24	2005	<i>A. pomarina</i>	0.196	0.804

Programmi Structure analüüsi tulemused

Isendi nr	Territoorium	Aasta	Liik	p (A. pomarina)	p (A. clanga)
46	10	2005	<i>A. pomarina</i>	0.864	0.136
47	25	2005	<i>A. pomarina</i>	0.215	0.785
48	26	2002	<i>A. pomarina</i>	0.756	0.244
49	27	2003	<i>A. pomarina</i>	0.894	0.106
50	28	2002	<i>A. pomarina</i>	0.92	0.08
51	29	2002	<i>A. pomarina</i>	0.912	0.088
52	30	2003	<i>A. pomarina</i>	0.939	0.061
53	31	2002	<i>A. pomarina</i>	0.948	0.052
54	32	2002	<i>A. pomarina</i>	0.859	0.141
55	33	2002	<i>A. pomarina</i>	0.915	0.085
56	34	2002	<i>A. pomarina</i>	0.485	0.515
57	34	2004	<i>A. pomarina</i>	0.664	0.336
58	35	1998	<i>A. pomarina</i>	0.797	0.203
59	36	2002	<i>A. pomarina</i>	0.919	0.081
60	37	2002	<i>A. pomarina</i>	0.531	0.469
61	38	2003	<i>A. pomarina</i>	0.939	0.061
62	39	2002	<i>A. pomarina</i>	0.858	0.142
63	40	2005	<i>A. pomarina</i>	0.39	0.61
64	41	2002	<i>A. pomarina</i>	0.857	0.143
65	42	2002	<i>A. pomarina</i>	0.922	0.078