

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
ZOOLOOGIA OSAKOND
TERIOLOOGIA ÕPPETOOL

Sandra Poks
PRUUNKARU (*Ursus arctos*) ISALIINIDE
FÜLOGEOGRAAFIA EURAASIAS

Magistritöö

Juhendajad:
MSc Peeter Anijalg
PhD Urmas Saarma

Tartu 2017

Infoleht

Pruunkaru (*Ursus arctos*) on laia holarktilise levikuga suurkiskja, kelle sugupooleid levivad erinevalt - emasloomad jäävad oma sünnikoha lähedusse ning isased rändavad pikemaid vahemaid. See on üks põhjustest, miks on pruunkaru fülogeograafilistes uuringutes vajalik analüüsida mõlema sugupoole rolli eraldi, kuna see võimaldab teha oluliselt täpsemaid järeldusi populatsioonides toimunud protsesside kohta. Antud töös uuriti isaliini rolli pruunkaru populatsioonide kujunemisel Euraasias, analüüsides Y-kromosoomi mikrosatelliite 403 isaskarul üle kogu Euraasia. Töö tulemused näitasid, et pruunkaru isaliinid jaotusid Euraasias 14 klastrisse, milledest osad olid seotud kindla geograafilise piirkonnaga, samas kui teiste levik oli väga lai, kattes suurema osa uurimisalast. Piirkonniti erines geneetiline varieeruvus üsna suures ulatuses. Euraasia pruunkarud paiknesid viimase jääaja maksimumi ajal refuugiumites tõenäoliselt lõuna pool Karpaate ning Sajaani-Altai regioonis Siberis ning keskkonnatingimuste paranedes hakkasid oma leviala erinevates suundades laiendama.

Märksõnad: pruunkaru (*Ursus arctos*), fülogeograafia, refuugium, Y-kromosoom, mikrosatelliit
B320 - süstemaatiline botaanika, zooloogia, zoogeograafia.

Brown bear (*Ursus arctos*) is a large carnivore with a wide Holarctic distribution. Different sexes of brown bear disperse differently - females stay closer to their birth area and males disperse further. This is one of the reasons why it is important to study both sexes separately and then make conclusions about the whole population based on these results. This research analyses Y-chromosome microsatellites of 403 male brown bears from all over Eurasia. The results demonstrated that brown bear paternal lineage is divided into 14 clades, some of which had region specific distribution, whereas the others were spread over a larger area in Eurasia. The most probable refuge areas for brown bears of Eurasia were situated south of the Carpathian Mountains and in the Altai-Sayan region in Siberia. After the climate stabilized bears started to expand their territories into different directions.

Keywords: brown bear (*Ursus arctos*), phylogeography, refugium, Y-chromosome, microsatellite
B320- systematic zoology, taxonomy, zoogeography

Sisukord

Infoleht	3
1. Sissejuhatus	6
2. Kirjanduse ülevaade	8
2.1 Pruunkaru	8
2.2 Y-kromosoom kui geneetiline marker	8
2.3 Jääaeg ja selle mõju	10
2.4 Varasemad fülogeograafilised tööd	12
3. Materjal ja meetodika.....	15
3.1 Proovid.....	15
3.2 Geneetiline analüüs.....	16
3.3 Populatsiooni geneetiliste andmete analüüs.....	18
4. Tulemused	20
4.1 Mikrosatelliitandmete statistiline analüüs.....	20
5. Arutelu.....	37
6. Kokkuvõte	43
7. Summary.....	44
Tänuavaldused	45
Kasutatud kirjandus	46

1. Sissejuhatus

Fülogeograafia kirjeldab fülogeneetiliselt seotud taksonite geograafilist paiknemist ja levimist ning seetõttu on molekulaarses ökoloogias ja süstemaatikas fülogeograafia-alastel uuringutel suur tähtsus (Jobling & Tyler-Smith 2003). Fülogeograafia üks põhilisi eesmärke on kindlaks teha, kas konkreetne liik koosneb ühest või mitmest geograafiliselt eraldatud ja iseseisvalt evolutsioneeruvast alamliigist ning kuidas need on omavahel fülogeneetiliselt seotud (Zink & Barrowclough 2008). Geenijärjestuste ruumilise leviku analüüsimiseks ja tõlgendamiseks on üldiselt vajalikud laialdased molekulaargeneetilised uuringud, seega on fülogeograafia piirteadus, mis hõlmab nii mikro- kui ka makroevolutsioonilisi aspekte (Avice 2000). Molekulaarsete meetodite abil on võimalik vaid vähese DNA koguse analüüsimisel teada saada väga palju mitmekülgset informatsiooni antud isendi või populatsiooni kohta.

Kõikides teaduslikes uuringutes on väga oluline metoodika valik- milliseid faktoreid analüüsida ja kuidas andmeid sünteesida. Nii on ka fülogeograafias määrava tähtsusega, milliseid geneetilisi markereid kasutada, kui uurida geenijärjestuste evolutsioonilisi seoseid ja päritolu. Igal markeril on iseloomulikud omadused ning erinevad markerid annavad informatsiooni genoomi eri osade kohta. Uurides korraga mitokondriaalset DNA-d (mtDNA), Y-kromosoomi ja autosomaalseid markereid, saab mitmekülgset infot populatsiooni või isendi kohta ning seetõttu on võimalik saada terviklikum pilt antud taksoni evolutsioonist (MacDonald 2008).

Fülogeograafilistes pruunkarude uuringutes on kõige domineerivamaks geneetiliseks markeriks olnud mtDNA, mille põhjal on tehtud järeldusi emaliini evolutsiooni kohta (Saarma *et al.* 2007; Keis *et al.* 2013). MtDNA laialdane kasutamine on igati mõistetu, sest markerina on sellel mitmeid häid külgi: mtDNA esineb rakus väga paljude kordustena, muteerub kiiresti ning rekombinatsioon imetajatel reeglina puudub või on harv. Kuid kuna emaliini pidi päranduv mtDNA ei võimalda teha järeldusi isaliinis toimunud fülogeograafiliste protsesside kohta, siis selle jaoks tuleks analüüsida Y-kromosoomi markereid (Bidon *et al.* 2014).

Pruunkaru (*Ursus arctos*) on maailmas üks suurimaid elusolevaid seltsi *Carnivora* esindajaid ning on laia holarktilise levikuga. Pruunkaru on kujunenud üheks fülogeograafia mudelorganismiks (Davison *et al.* 2011). Põhjuseks on liigi väga lai levik ning suured

kehamõõtmel, mistõttu on karude arheoloogilisi luuleide mitmetest piirkondadest ülenende levila (Sommer & Benecke 2005).

Pelgupaik ehk refuugium on sobivate keskkonnatingimustega piirkond, kus taimed, loomad ja muud elusolendid suudavad ebasoodsad ajad üle elada (Stewart *et al.* 2010). Sellised ebasoodsad tingimused valitsesid näiteks viimasel jääajal. Umbes 26,5- 19 tuhat aastat tagasi oli viimane jäätumise kõrgpunkt ning sel perioodil olid paljud liigid sunnitud taanduma ebasobivatest piirkondadest refuugiumitesse (Clark *et al.* 2009). Refuugiumi asukoha üheks indikaatoriks võiks olla piirkonnas elutsevate organismide suurem geneetiline varieeruvus (Stewart *et al.* 2010). Refuugiumite asukohtade kindlaks tegemisel on lisaks liikide migratsioonistsenaariumite lahendamisele ka väga oluline rakenduslik eesmärk. Kui tulevikus peaksid muutuma keskkonnatingimused jälle tänapäevaste liikide jaoks ebasobivamaks kui need on praegu, siis suure tõenäosusega muutuvad uuesti oluliseks kunagised refuugiumid. Seetõttu oleks oluline keskkonnakaitse eesmärk prioritseerida just neid kunagisi refuugiumialasid, mis tulevikus võivad paljude liikide jaoks raskete keskkonnatingimuste juures muutuda oluliseks pelgupaigaks.

Käesolevas töös püstitati kolm eesmärki:

- 1) pruunkaru isaliini struktuuri kirjeldamine Euraasias ja selle geneetilise mitmekesisuse väljaselgitamine;
- 2) võimalike migratsiooni-stsenaariumite väljapakumine;
- 3) potentsiaalsete refuugiumi-alade tuvastamine.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1 Pruunkaru

Pruunkarudele on omane levimismuster, kus sugupooled hajuvad erinevalt (Zedrosser *et al.* 2007). Isasloomad hajuvad sünnipaigast kaugemale kui emased ning seetõttu võib arvata, et eri sugupoolte uurimisel on tulemused veidi erinevad. Paljude liikide seas on see tavaline, et üks sugupool hajub kaugemale kui teine. Imetajate seas on valdavam olukord, kus emased on filopatrilisemad ehk püsivad terve elu sünnipaiga läheduses, kuid näiteks lindudel on vastupidi- tihti on emased need, kes levivad kaugemale (Greenwood 1980).

On leitud, et võrreldes Y-kromosoomiga näitab mtDNA oluliselt tugevamat struktureeritust (Bidon *et al.* 2014). Üks põhjustest võib olla sugupoolte erinev hajumismuster. Seetõttu on väga oluline uurida erinevate sugupoolte rolli ning nende tulemusi kombineerides teha järeldusi kogu liigi või populatsiooni kohta.

Põhja- Euraasias on pruunkaru levila pidev, ulatudes Skandinaaviast Kaug-Idani, kuid samas paljud lõunapoolsed populatsioonid on ohustatud ja fragmenteeritud peamiselt inimtegevuse tõttu. Fennoskandias ja Baltimaades on karu populatsioonid kahe viimase sajandi jooksul läbinud tõsise pudelikaela. Tänapäevaks on pruunkarude populatsioonid Eestis, Soomes ja Rootsis taastunud, kuid Norras, Leedus ja Lätis on nad veel pudelikaela staadiumis (Saarma *et al.* 2007; Davison *et al.* 2011). Geneetiline pudelikael on olukord, kus populatsiooni arvukus järsult langeb, kuid mõne aja möödudes taastub. Selle tulemusena enamasti väheneb populatsiooni geneetiline mitmekesisus (Waits *et al.* 2000).

2.2 Y-kromosoom kui geneetiline marker

Y-kromosoom on sugukromosoom, mis on imetajatel iseloomulik vaid isastele. Imetajate emasloomadel on kromosoomipaar XX ning isastel XY. Y-kromosoom erineb teistest kromosoomidest mitmete omaduste poolest. Y-kromosoom koosneb kahest osast: pseudoautosomaalne piirkond, mis rekombineerub X- kromosoomiga ning ülejäänud osast, mis hõlmab umbes 90% Y-kromosoomist. Viimane ei rekombineeru ning selle jaoks kasutatakse lühendeid MSY (*male-specific region of the Y-chromosome*), NRY (*non-recombining Y*) või NRPY (*non-recombining portion Y*). Meioosis rekombineerumise puudumine võimaldab Y-kromosoomi haplotüüpidel vähem muutuda ning koos edasi

päranduda, sest ainsaks muutvaks mehhanismiks on mutatsioonide teke. Seega Y-kromosoom pärandub isalt pojale edasi väiksemate muutustega ning seetõttu on võimalik ilma suuremate analüütiliste probleemideta kindlaks teha haplotüüpe ning uurida nende evolutsioneerumise ajalugu (Jobling & Tyler-Smith 2003; Bidon *et al.* 2014).

Y-kromosoomi põhjal koostatud uuringute tulemused võivad mtDNA või tuumagenoomi töödega võrreldes erineda. Need erinevused võivad tuleneda järjestuste mitmekesisusest, isendite levikust ja isendite migratsiooni geograafilistes barjääridest (Meadows *et al.* 2004). Helleborgi ja Ellegreni (2004) poolt läbi viidud uuringus, milles nad võrdlesid viie erineva liigi Y-kromosoomi mitmekesisust teiste genoomi osadega, leiti, et Y-kromosoomi varieeruvus oli madalam kõigi viie liigi puhul. See viitab asjaolule, et Y-kromosoomi madal mitmekesisus võib olla imetajatele omane tunnus. Y-kromosoomi madalam polümorfsus võib tuleneda isaste heterogameetsusest, kuid lisaks sellele võivad mitmekesisust mõjutada ka mitmed teised tegurid nagu näiteks mutatsioonikiirus, valiku mehhanismid, efektiivse populatsioonisuuruse erinevused ja isendite migratsioonimustrid. (Hellborg & Ellegren 2004; Meadows *et al.* 2004).

Esiteks kui mutatsioonid tulenevad replikatsioonil tekkivatest vigadest ja isaste sugurakud läbivad mitmeid kordi rohkem mitotoilisi jagunemisi kui emaste sugurakud, siis peaks isassugurakkude mutatsioonikiirus olema suurem (Montell *et al.* 2001). Suurem mutatsioonikiirus peaks viitama ka suuremale mitmekesisusele, kuid uuringud näitavad, et Y-kromosoomis see nii ei ole (Hurst & Ellegren 1998; Hellborg & Ellegren 2004).

Teiseks, kuna suurem osa Y-kromosoomist pole rekombineeruv ning seetõttu on see ka erinevatele valiku mehhanismidele väga vastuvõtlik (Berlin & Ellegren 2004). Valik on see, mis mõjutab kogu kromosoomi ning järjestuse sagedus tõuseb äkilisemalt kui geenitriivi puhul (Jobling & Tyler-Smith 2003).

Kolmandaks Y-kromosoomi mitmekesisuse mõjutavaks faktoriks on efektiivne populatsiooni suurus. Populatsioonis, kus sugude suhe on 1:1, on nii mtDNA kui ka Y-kromosoomi efektiivne populatsioonisuurus kõigest üks neljandik autosoomide omast, sest need on haploidsed ja antakse edasi vaid ühe soo kaudu. Lisaks vähendab Y-kromosoomi efektiivse populatsiooni suurust ka erinevus järglaste arvus, mis on isastel reeglina suurem ning seda eriti polügüünsetel liikidel. Seetõttu on Y-kromosoom kergemini mõjutatav geenitriivi mehhanismist (Hurles & Jobling 2001; Pérez *et al.* 2011).

Neljandaks, mtDNA ja Y-kromosoomi uuringute tulemuste erinevusi võib põhjustada ka isendite migratsioon. Migratsioon põhjustab geenivoolu, mis on liigisisene geenide liikumine ühest alampopulatsioonist teise ning see omakorda põhjustab geneetilise ühtlustumise nendes populatsioonides, mille vahel toimub geenivool (Kundu & Ghosh 2015). Isaste ja emaste migratsioonimustrid võivad liigiti olla väga erinevad ja selleks, et mõista veel paremini liigi bioloogiat oleks vaja analüüsida nii isa-, ema- kui ka ühisliini. Seetõttu tuleks väga hoolikalt kaaluda, milliste omadustega markerit analüüsiks kasutada (Pérez *et al.* 2011). Kokkuvõttes võivad Y-kromosoomi mitmekesisust mõjutada mitmed faktorid ning kõik need tegurid mõjutavad geneetilist mitmekesisust genoomi eri osades erinevalt.

Mikrosatelliidid, mida nimetatakse ka lühenditega SSR (*simple sequence repeats*) ja STR (*short tandem repeats*), on DNA järjestused, mis koosnevad lühikestest, enamasti 1-6 aluspaarilistest tandemkordustest, mis moodustavad blokke pikkusega kuni 100 aluspaari. Mikrosatelliidid on küllaltki polümorfseid ja neid on genoomis palju, mistõttu on need populatsioonigeneetikas leidnud laialdast kasutust (Goldstein & Schlötterer 1999). Et mikrosatelliidi lookustest leitud alleelide arv on suur, siis saab neid kasutada ka lähedalt suguluses olevate isendite uurimiseks. Mikrosatelliite võib leida üle kogu genoomi. Need asuvad nii kodeerivates kui ka mittekodeerivates piirkondades. Analüüsides autosomaalses DNA-s paiknevaid mikrosatelliite saab infot mõlema vanemliini kohta ning kui analüüsida Y-kromosoomis paiknevaid mikrosatelliite, saab infot isaliini kohta (Jurka 2000). Uniparentaalseteks nimetatakse markereid, mis päranduvad edasi ühte vanemliini pidi, nagu näiteks Y-kromosoomi DNA ja mtDNA. Biparentaalsed päranduvad aga mõlemat vanemliini pidi ning sellistest markeriteks on näiteks autosomaalsed mikrosatelliidid.

Seega analüüsides Y-kromosoomi mikrosatelliite saab ülevaate pruunkaru isaliinide fülogeograafiast ning kombineerides neid tulemusi mtDNA ja autosomaalsete markerite põhjal tehtud töödega, võiks saada põhjalikuma ülevaate pruunkarude migratsioonist pärast viimast jääaega.

2.3 Jääaeg ja selle mõju

Pika ajaloo vältel toimunud suured keskkonnamuutused on arvestatavalt mõjutanud nii loomade, taimede kui teiste elusorganismide levikut ja populatsioonide struktuuri. Pleistotseenis toimunud jäätumised sundisid paljusid parasvöötme liike taganema

refuugiumitesse, kus olid ellujäämiseks sobivad keskkonnatingimused. Refuugiumiteks nimetatakse sobivate keskkonnatingimustega piirkondi, kus taimed ja loomad suudavad ebasoodsad ajad üle elada (Stewart *et al.* 2010). Umbes 26,5- 19 tuhat aastat tagasi oli viimane jäätumise kõrgpunkt ning peale seda tekkis paljudel liikidel võimalus hakata oma leviala laiendama põhja suunas (Clark *et al.* 2009). Rekolonisatsioon toimus liigiti erinevalt sõltuvalt mitmetest faktoritest näiteks nagu populatsioonitihedus ja levimisvõime. Loomade liikumiste mõistmiseks on asendamatuks abiks molekulaarsed meetodid, sest piiratud alal refuugiumites olemine ja uuesti rekoloniseerimine on loomade genofondi jätnud jäljed. Uurides vastavaid geneetilisi markereid on võimalik saada vihjeid loomade fülogeograafia kohta (Saarma *et al.* 2007).

Viimase jääaja maksimumi ajal kattis mandrijää suurt osa Põhja-Euroopast ja Põhja-Ameerikast, sealhulgas ka mitmeid mäestikke, näiteks nagu Alpid, Andid, Kaljumäestik ja Jakutski mäestik (Clark *et al.* 2009). Nii suur hulk akumulunud jääd vähendas maailmamere taset võrreldes tänapäevaga ning selle tagajärjel tekkisid maasillad, mis tänapäeval on vee all, kuid sel ajal oli loomadel võimalik nende kaudu liikuda ning migreeruda piirkondadesse, mis praegu võimalik ei ole (Rohling *et al.* 1998; Hewitt 2000). Näiteks Euraasia ja Põhja-Ameerika mandrite vahele tekkis Beringi maasild, mida mööda oli loomadel võimalik liikuda kahe suure mandrimassiivi vahel. Rebaste (*Vulpes vulpes*) põhjal tehtud töös leiti, et tänapäeval Põhja-Ameerikas esinevad rebasepopulatsioonid on geneetiliselt väga lähedased Euraasia rebastega, mis annab alust arvata, et rebased on kunagi migreerumiseks aktiivselt kasutanud Beringi maasilda (Statham *et al.* 2014). Põhja-Ameerikas fossiilsete leidude põhjal võib ka huntide kohta väita, et viimase jääaja maksimumi ajal, kui Beringi maasild eksisteeris, kasutasid seda hundid, et liikuda Euraasiast Ameerikasse. Lisaks sellele võimaldasid Pleistotseeni maasillad ka Hokkaido ja Jaapani saarte lõunaosa koloniseerimist (Koblmüller *et al.* 2016). On ka leitud, et nii vapiti ehk kanada hirv (*Cervus canadensis*) kui ka inimene (*Homo sapiens*) on kasutanud Beringi maasilda Põhja- Ameerikasse migreerumiseks. Arvatakse, et sarnaste levimismustrite põhjuseks võisid olla ühesugused nõudmised keskkonnatingimustele (Kitchen *et al.* 2008; Meiri *et al.* 2013).

Üks suurimaid jääaja-aegseid refuugiumeid võis asuda tänapäeva Slovakkia territooriumil, Karpaatia mäestiku lääneosas. See oli väga sobiv ala just põhjapoolse levikuga liikide jaoks, sest see oli viimane piir, kuhu jääkilp ei ulatunud ja seetõttu valitsesid seal elamiseks sobivad keskkonnatingimused. Arvatakse, et tegemist oli kõige

põhjapoolsema suure refuugiumiga (Saarma *et al.* 2007). On pakutud, et sellest refuugiumist pärit karud võisid olla need, kes rekoloniseerisid Põhja-Euroopa (Sommer & Benecke 2005). On leitud, et Kesk-Euraasias asuvas Sajaani-Altai mäestikus valitsevad tänapäeval sellised keskkonnatingimused, nagu võisid seal olla viimase jääaja maksimumi ajal. Seega on seal valitsenud pikka aega väga stabiilsed keskkonnatingimused (Pavelková Řičánková *et al.* 2014). Sellele viitab ka asjaolu, et Altai piirkonnast on leitud nii Denissovi inimese, tänapäeva inimese (*Homo sapiens*) kui ka neandertaallase (*Homo neanderthalensis*) luid (Árnason 2016). Seega ka mitmete inimese (*Homo*) perekonda kuuluvate liikide jaoks oli Altai piirkond sobivate keskkonnatingimustega. Refuugiumi asukoha üheks indikaatoriks võiks olla piirkonnas elutsevate organismide suurem geneetiline varieeruvus (Stewart *et al.* 2010).

Loomade reageerimist toimunud suurtele keskkonnamuutustele on vajalik uurida, et luua mudeleid, kuidas võivad loomad käituda tänapäeval ja tulevikus seoses toimuvate suurte kliimamuutustega (Stewart *et al.* 2010).

2.4 Varasemad fülogeograafilised tööd

Vaatamata sellele, et inimese Y-kromosoom sekveneeriti juba aastal 2003 (Skaletsky *et al.* 2003), pole teiste liikide puhul väga kiiret arengut selles vallas toimunud (Hallast & Jobling 2017). Siiani on täispikkuses MSY sekveneeritud vaid neljal imetajaliigil: inimesel (*Homo sapiens*), šimpansil (*Pan troglodytes*), reesusmakaagil (*Macaca mulatta*) ja koduhiirel (*Mus musculus*) (Skaletsky *et al.* 2003; Hughes *et al.* 2010; Hughes *et al.* 2012; Soh *et al.* 2014). Põhjuseks võib olla see, et Y-kromosoomi assambleerimine on arvukate kordus- ja palindroomsete järjestuste tõttu probleemne, aeganõudev ja kallis. Seetõttu pole teiste liikide jaoks piisavalt Y-spetsiifilisi polümorfseid markereid välja töötatud. Et Y-kromosoomi markerid oleksid informatiivsed peavad need olema heterogameetsele soole spetsiifilised ning piisaval määral polümorfseid (Greminger *et al.* 2010). Kui mtDNA-d leidub genoomis väga paljudes kordustes, siis Y-kromosoomi DNA-d on palju vähem. See on ka üheks põhjuseks, miks mtDNA-d on võrreldes Y-kromosoomiga laialdasemalt uuritud. Isegi kui proov pole suurepärase kvaliteediga, siis on tõenäosus suur, et mtDNA-d proovis leidub. Seevastu ebakvaliteetse proovi puhul võib Y-kromosoomi DNA olla niivõrd lagunenu, et seda pole võimalik enam amplifitseerida.

Pruunkaru fülogeograafiat on üsnagi põhjalikult uuritud, kuid enamik töid on läbi viidud kas mtDNA (nt. Saarma *et al.* 2007; Korsten *et al.* 2009; Keis *et al.* 2013) või autosomaalsete mikrosatelliitide (nt. Waits *et al.* 2000; Tammeleht *et al.* 2010) põhiselt. Y-kromosoomil põhinevad uuringuid on seevastu üksikuid. Bidoni ja kolleegide (2014) läbi viidud töö eesmärk oli võrrelda Y-kromosoomi põhjal saadud andmeid mtDNA ja autosoomide omadega. Leiti, et erinevalt mtDNA andmetest, ei näidanud Y-kromosoom nii tugevat populatsiooni geograafilist struktureeritust. Kuna karudel on tavaline, et isasloomad on need, kes sünnikohast migreeruvad (Zedrosser *et al.* 2007), siis on väga oluline uurida lähemalt ka Y-kromosoomi, mis annab infot isasloomade fülogeograafia kohta. Antud uurimuses analüüsiti Y-kromosoomi ning leiti mitmeid erisusi mtDNA põhjal koostatud fülogeneesist (Bidon *et al.* 2014). Näiteks varasemad mtDNA uuringud on näidanud, et jää- ja pruunkaru on parafüleetilised liigid ning nende vahel on läbi ajaloo toimunud mitmeid kordi hübriidiseerumine (Edwards *et al.* 2011). Seevastu aga Y-kromosoomi põhjal on pruun- ja jääkarud monofüleetilised liigid, kus pole isaliinis introgressiooni toimunud. Ka selles uuringus dokumenteeriti Y-kromosoomi madalat mitmekesisust. Peale Y-kromosoomi väiksema efektiivse populatsioonisuuruse arvesse võtmist oli mitmekesisus vaid 10% autosoomide omast (Bidon *et al.* 2014). Ka Pérez ja teiste (2011) poolt läbi viidud töö mägikitsede (perekond *Rupicapra*) põhjal toob välja mtDNA ning Y-kromosoomi uuringute tulemuste erinevused ning Y-kromosoomi märgatavalt madalama mitmekesisuse. Antud tööd on suurepäraseks näideteks, kui vajalik on uurida nii uni- kui ka biparentaalseid markereid, et saada kompleksseim tulemus, mille põhjal saaks teha järeldusi loomade fülogeneetika kohta.

Schregel ja teised (2015) keskendusid oma pruunkarusid uurivas töös samuti isaliinile. Analüüsiti üheksat Y-kromosoomi mikrosatelliiti ja kolme Y-kromosoomi üksiknukleotiidi polümorfismi (Y-SNP). Töö eesmärgiks oli välja uurida, kui suur roll oli isakarude geenivoolul Põhja-Euroopa levialal pruunkarude populatsioonide taastumisel. Umbes 400 isaskaru analüüsimisel leiti, et uuritav ala jagunes väga selgelt kaheks ning peale pudelikaela toimusid neil aladel erinevad protsessid. Läänepoolsel alal oli populatsiooni rajajaks vaid neli haplotüüpi, millest sai alguse üha suurenev populatsioon ilma märkimisväärse hilisema geenivooluta. Seetõttu on antud ala tänapäeval geneetilisel madalama mitmekesisusega kui idapoolne ala. Selle töö tulemused annavad alust arvata, et isaskarude geenivool ei ole põhiliseks põhjuseks, miks populatsioon taastus. Idas oli tegemist vastupidise stsenaariumiga-toimus pidev geenivool ja segunemine, mis on andnud

aluse palju suuremale geneetilisele mitmekesisusele (Schregel *et al.* 2015). Seega antud uuring näitab, et populatsiooni arvukuse taastumiseks pole vajalik väga aktiivne isaste geenivool, kuid sel viisil taastuv populatsioon on palju väiksema geneetilise mitmekesisusega kui seda on pideva geenivoolu puhul.

Iacolina ja kolleegid (2016) töötasid välja metsseale (*Sus scrofa*) spetsiifilised Y-kromosoomi markerid, et välja selgitada isaste geenivoolu olulisust populatsioonis ning võrrelda metssigade Y-kromosoomi mitmekesisust teiste metsloomade varasemate töödega. Leiti, et sigade Y-kromosoomi mitmekesisus on võrreldav teiste liikide Y-kromosoomi mitmekesisusega.

Seega kokkuvõtvalt võiks öelda, et erinevate metsloomade fülogeograafiat on põhjalikult uuritud, kuid need tulemused baseeruvad suures ulatuses emaliini andmetel. Kui sellele lisaks uurida ka isaliini, siis see annaks detailsema ja mõlemat sugupoolt arvestava pildi, sest mitmed tööd on välja toonud, et emas- ja isasliini fülogeograafia ei pruugi täielikult kattuda, vaid pigem täiendavad üksteist.

3. Materjal ja metoodika

Töös kasutatud proovid on saadetud erinevate koostööpartnerite poolt, seega üliõpilane proovide kogumisel ei osalenud. Eraldasid ja puhastasid DNA umbes 50 proovist, genotüüpiseerisid 246 proovi ning määrasid geel-elektroforeesi abil 66 isendi soo. Samuti määrasid 246 proovi alleelide pikkused ning koostasid vastavad tabelid (157 proovi alleelide pikkused määras P. Anijalg) ning teostasid kogu andmeanalüüsi ja kaartide koostamise.

3.1 Proovid

Töös analüüsitud proovid (n=403) on pärit Euraasia erinevatest piirkondadest. Proovid pärinevad üle kogu Venemaa (n=196), Soomest (n=77), Rootsist (n=17), Eestist (n=14), Rumeeniast (n=31), Slovakiast (n=66) ning Horvaatiast (n=2). Proovide seas on liha-, vere-, karva- ja nahaproove, mis on kogutud aastatel 1997-2015 seaduslikult kütitud karudelt. Lisaks nendele oli proovide seas üksikuid karusid, kes olid hukkunud mõnel muul põhjusel, näiteks nagu autoavariis, vms. Enne DNA eraldamist säilitati liha- ja nahaproove 96%-lises etanoolis -20°C juures. 96% etanoolis on vajalik proov säilitada, sest etanool seob ära proovis leiduva vee. Vesi tuleb eemaldada, et inhibeerida nukleasid, mis lagundavad DNA-d. Karvu säilitati paberümbrikus ning -20°C juures. Hiljem eraldatud DNA-d säilitati samuti temperatuuril -20°C.

DNA eraldamiseks kasutati High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) ning järgiti tootjapoolseid instruktsioone.

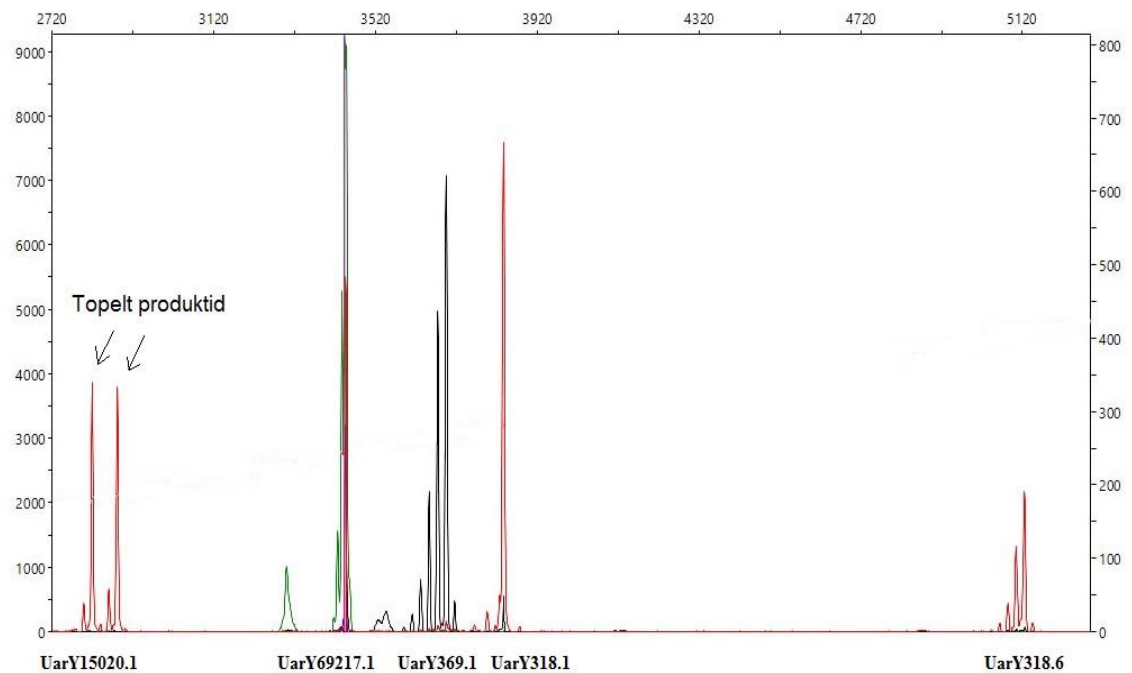


Joonis 1. Töös analüüsitud 403 isaskaru proovi asukohad üle kogu Euraasia.

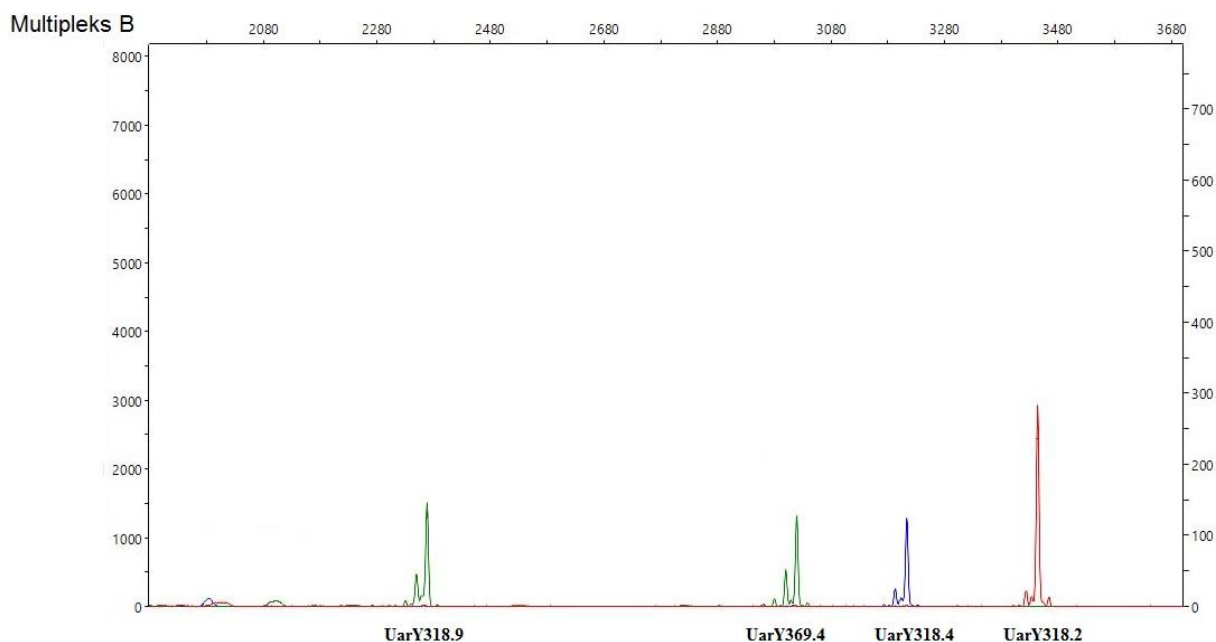
3.2 Geneetiline analüüs

Genotüpiseerimisel geneetiliste markeritena kasutati algselt 9 varem kirjanduses kirjeldatud Y-kromosoomi mikrosatelliidilookust: UarY318.4, UarY318.2, UarY318.9, UarY369.4, UarY318.1, UarY69217.1, UarY318.6, UarY15020.1, UarY369.1 (Bidon *et al.* 2014). Hilisem analüüs tehti aga kaheksa mikrosatelliidi põhjal ning jäeti välja UarY15020.1, sest see lookus andis topelt produkti, mis pole Y-kromosoomi puhul normaalne (Joonis 2).

Multipleks A



Joonis 2. Kapillaarelektroforeesi kromatogramm viiest pruunkaru mikrosatelliidist multipleksisegus A.



Joonis 3. Kapillaarelektroforeesi kromatogramm neljast pruunkaru mikrosatelliidist multipleksisegus B.

Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) viidi läbi 10 mikrolitris reaktsioonisegus, mis koosnes 1x PCR puhvrist (Applied Biosystems), 2 mM MgCl₂-st (Applied Biosystems), 0,2 mM dNTP-st (Thermo Scientific), 1U µl termostabiilsest DNA-polümeraasist Smart Taq Hot (NAXO), 1 µl praimerite segust (multipleks A: UarY318.6- 6pmol, UarY369.1- 4 pmol, UarY15020.1- 2 pmol, UarY318.1- 4 pmol, UarY69217.1- 2pmol; multipleks B: UarY318.9- 2 pmol, UarY318.4- 2 pmol, UarY318.2- 6 pmol, UarY369.4- 2 pmol) ning 1 µl eelnevalt eraldatud DNA-st.

Spektrofotomeetriga mõõdetud kontsentratsioonid varieerusid väga suurel määral. Kõige väiksem mõõdetud kontsentratsioon oli 0,45 ng/µl ning kõige suurem 377 ng/µl. Vastavalt proovi kontsentratsioonile tehti lahjendused nii, et proovi kontsentratsioon oleks 2,5-5 ng/µl. Proove, mis olid alla 2,5 ng/µl, ei lahjendatud ning tulemused olid loetavad ja kvaliteetsed. Karvadest ja verest eraldatud proovide kontsentratsioonid olid madalamad kui lihast eraldatud proovidel.

PCR viidi läbi järgmistel tingimustel: polümeraasiga seotud antikeha denatureeriti 95°C juures 20 minutit, sellele järgnes 3 etappi, mida oli 35 tsüklit. Nendeks etappideks olid ahela denatureerimine 94°C juures 30 sekundit, praimerite seondumine 69°C juures 30 sekundit ning DNA süntees 72°C juures 1 minut. 35 tsüklile järgnes 7 minutiline polümeraasi ekstensioonietapp 72°C juures. PCR-ile eelnev segude valmistamine ja

hilisem töö PCR-i produktidega leidsid aset erinevates ruumides, et vältida kontaminatsiooni.

Kõikide koostööpartnerite poolt saadetud proovide kohta polnud infot, kas tegu on emas- või isasloomaga ning seetõttu tuli nende kohta kõigepealt välja selgitada looma sugu. Selleks kanti 5 µl PCR-i produkti geelelektroforeesi geelile ning saadud produkti pikkuse hindamiseks kanti geelile ka pikkusmarker FastRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific). Kui geelil oli produkti näha, oli tegemist isasega ja produkti puudumisel emasloomaga.

Amplifitseeritud PCR-i produktidest tehti veega 20-kordsed lahjendused. Lahjendusest 10 µl tõsteti PCR-plaadile ja lisati sellele 0,2 µl GeneScan-500LIZ pikkusmarkerit (Applied Biosystems). Saadud produktid lahutati kapillaarelektroforeesil sekvenaator ABI 3130xl Genetic Analyzeriga (Applied Biosystems).

Veaprotsendi arvutamiseks viidi analüüs uuesti läbi 45 proovi puhul, mis valiti kogu valimist (n= 403) juhuslikult. Kõik kontrollgrupis olnud tulemused klappisid algsete tulemustega, seega analüüsi veaprotsent oli 0.

3.3 Populatsiooni geneetiliste andmete analüüs

Alleelide pikkused määrati programmiga Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems) ning andmed kanti tabelisse. Saadud alleeli pikkuste ümardamiseks kasutati programmi Allelogram (Morin *et al.* 2009).

Programis R viidi läbi hierarhiline klasteranalüüs, kasutades selleks R'i funktsiooni *hclust* (R Core Team 2013). Hierarhiline klasterdamine ehitab hierarhiat alt üles ning ei nõua, et enne analüüsi läbiviimist oleks klastrite arv määratud. Algoritm töötab järgmiselt: paneb iga andmepunkti eraldi klastrisse, identifitseerib kaks kõige lähemat klastrit ja kombineerib need üheks klastriks, kordab eelmist sammu kuni kõik andmepunktid on ühes klastris. Hierarhilise klasterdamise meetodeid on mitmeid. Analüüs viidi läbi kõigi nelja meetodiga ning võrreldi tulemusi. Lõplik puu valiti meetodiga *complete*, mis sisaldas kõige enam erinevate meetodikate omavahel kokkulangevaid osi ning ei esinenud geograafiliselt võimatuid lahendusi. Selline klastriteks jaotumine näitab isaliinis toimunud kaugemasse minevikku ulatuvaid lahknemisi.

Seejärel jagasime valimi ka piirkonniti 12 grupiks, et saada ülevaadet, milline on geneetiline mitmekesisus konkreetsetes riikides või piirkondades. Selline jaotus võib anda informatsiooni hilisema ajaloo kohta nagu näiteks pudelikaelad või muud geneetilist mitmekesisust mõjutanud protsessid.

R-i paketi *poppr* (Kamvar *et al.* 2014) abil arvutati genotüübilise mitmekesisuse erinevad indeksid. Kogu valim jagati 12 piirkonnaks. Iga riik moodustas ühe piirkonna välja arvatud Venemaa, mis jagati omakorda Lääne-Venemaaks (Uuralitest läänepoolsele jääv ala), Iturupi saareks, Sahhalini saareks, Kamtšatka poolsaareks ja -Altai regiooniks. Venemaa jagati osadeks mitmetel põhjustel. Esiteks vaadeldi saari ja poolsaari eraldi aladena, sest võib esineda geograafiline liikumisbarjäär mandri ja saare vahel. Samal põhjusel eraldati ka Lääne-Venemaa eraldi piirkonnaks - Uuralite mäestik võib enamike karude jaoks olla migratsioone takistav barjäär, mis põhjustab geneetilise eristumise. Ning teiseks alade eristamise põhjuseks oli kirjanduse põhjal arvatava refuugiumi asukoha kontrollimine. Mitmed autorid on arvatavaks refuugiumiks pakkunud Altai piirkonda ning seetõttu käsitlesime seda kui eraldi regiooni (Pavelková Řičánková *et al.* 2014).

Proovide asukohad kaardil märgiti vabavara programmiga QGIS. Proovid kanti kaardile ning iga klaster värviti eri tooni. Eraldi märgiti ära ka identse genotüüpiga isendid. Vaadati, kuidas on klastrisisesed isendid jaotunud ning selle põhjal tehti järeldusi migratsioonistsenaariumite kohta.

4. Tulemused

4.1 Mikrosatelliitandmete statistiline analüüs

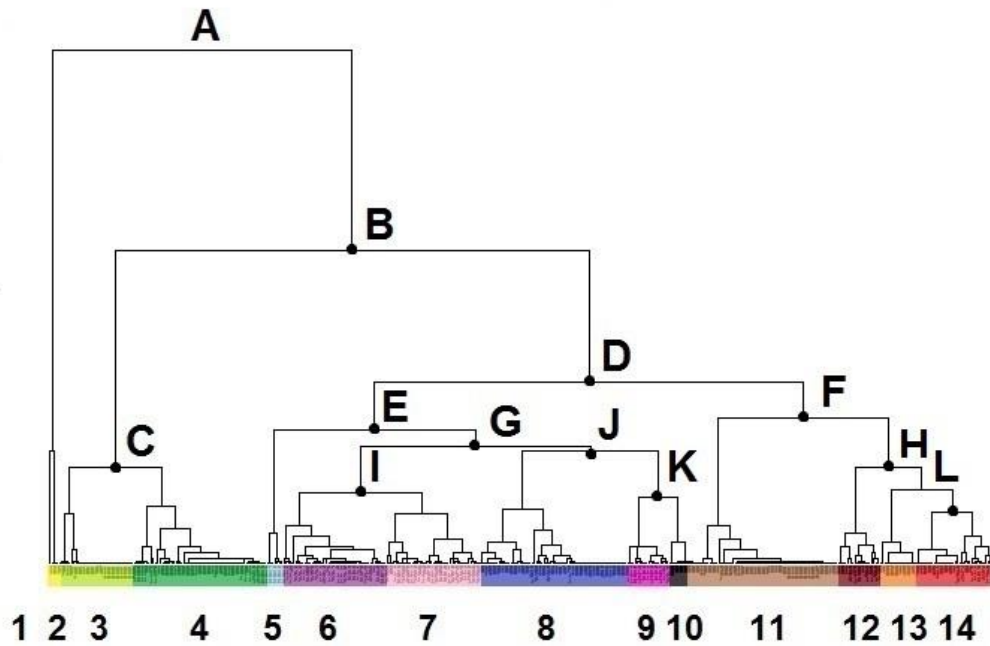
Kõigepealt leiti iga markeri puhul keskmine alleelide arv, mis oli kõrgeim lookuse UarY369.1 puhul (10) ning kõige madalam UarY69217.1 puhul, millel varieeruvus puudus (1).

Tabel 1. Alleelide arv lookuste kaupa

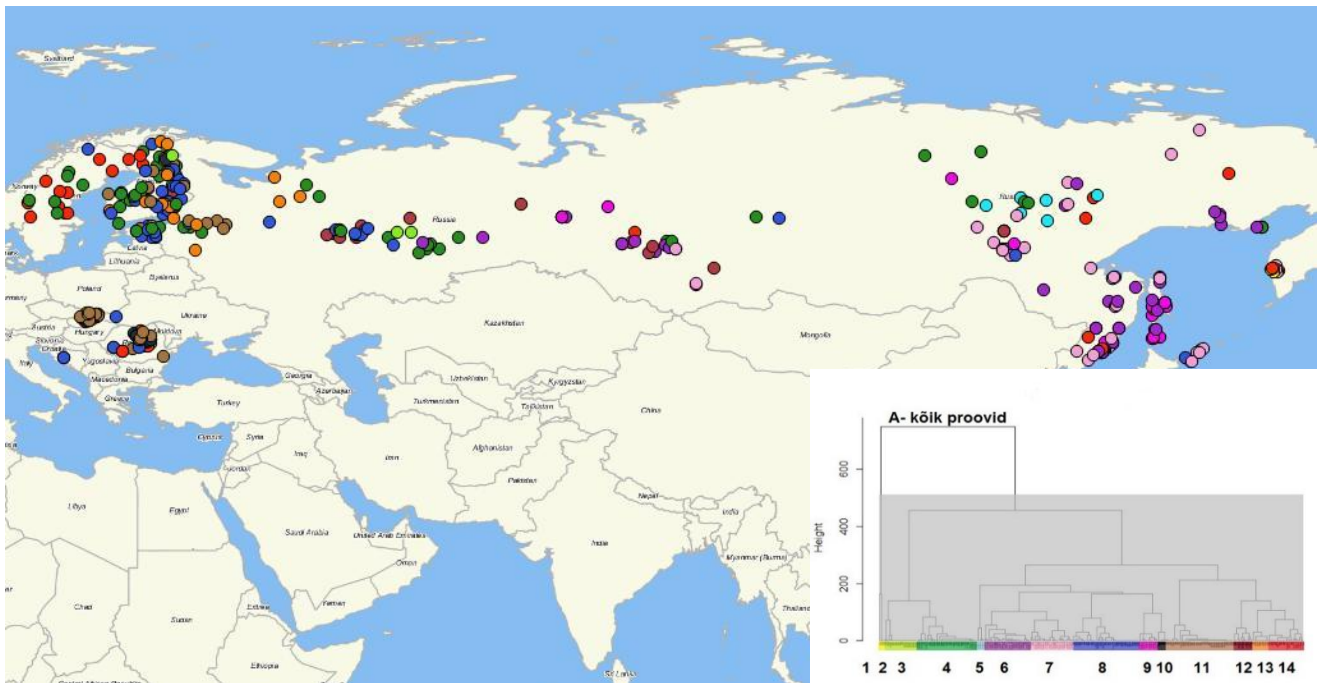
Lookus	Alleelide arv
UarY69217.1	1
UarY318.4	2
UarY318.2	4
UarY318.9	4
UarY318.1	4
UarY318.6	6
UarY369.4	8
UarY369.1	10

Algsesse PCR-i kaasati 251 isaskaru proovi, millest ebatäielikke tulemusi andsid neli ning need jäeti edaspidisest analüüsist välja. Selle magistritöö raames eraldatud proovidele lisati ka varasemalt genotüüpiseeritud, kuid seni avaldamata, 156 proovi andmed. Seega kokku oli antud töö valim 403 isaslooma proovi.

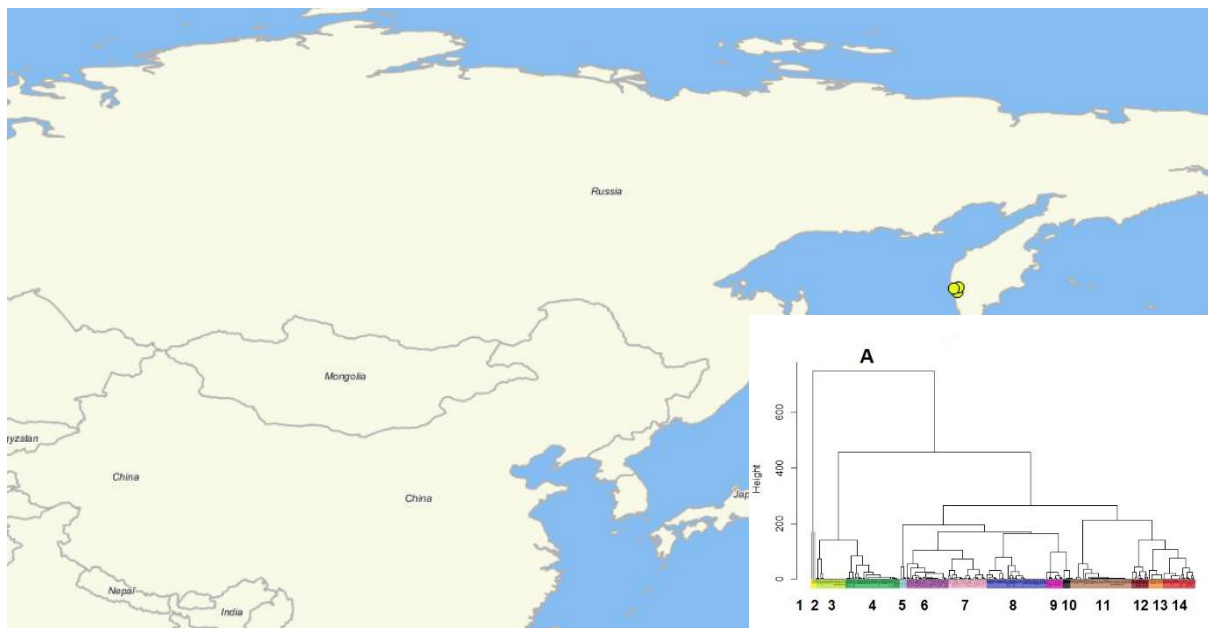
Programmis R läbi viidud hierarhilise klasteranalüüsi tulemusena saadi Y-kromosoomi fülogeneesipuu, mis kirjeldab analüüsitud pruunkarude geneetilist sarnasust. Puu üldist topoloogiat hinnates jaotusid proovid 14 klastrisse (joonis 4).



Joonis 4. Programmiga R hierarhilise klasterdamise tulemusel saadud pruunkarude Y-kromosoomi kaheksa mikrosatelliit-lookuse variatsioonil põhinev fülogeneesipuu. Puul on kujutatud 403 isaskaru klasterdumine Euroosiast. Numbrid 1-14 tähistavad klasterdamise tulemusel saadud eri klastreid. Tähed A-L tähistavad erinevaid klaade.

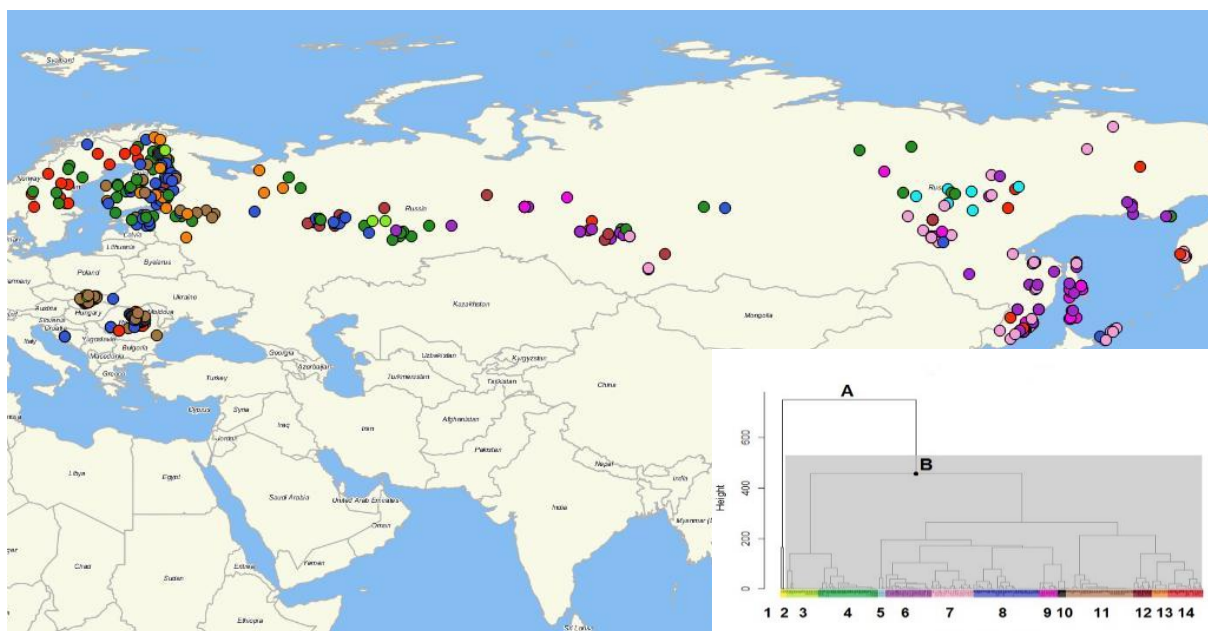


Joonis 5. 403 analüüsitud isaskaru proovid on klasterite kaupa kantud kaardile ning iga klaster (1-14) on tähistatud eraldi värviga.

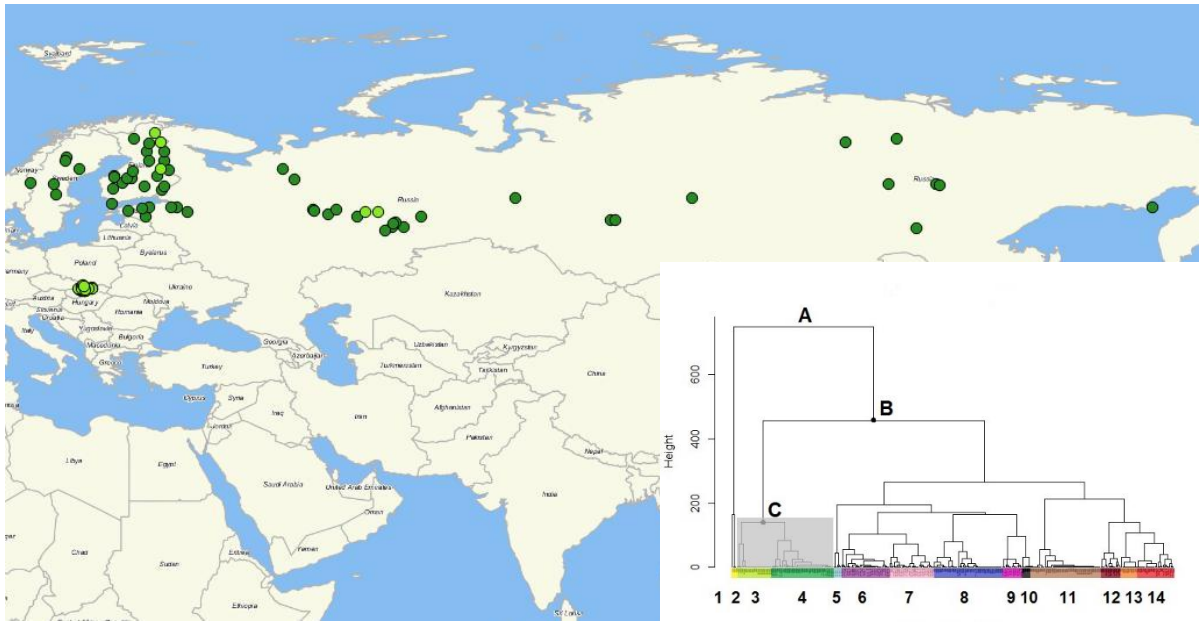


Joonis 6. Klastrite number 1 ja 2 geograafiline levik. Klastrite isendid on tähistatud kollase värviga.

Kõige varem lahknesid klastrid 1 ja 2, mis asuvad vaid Kamtšatka poolsaarel. Tõenäoliselt pole peale lahknemist toimunud klastrite 1 ja 2 ning ülejäänud klastrite vahel geenisiiret ja seetõttu on Kamtšatka poolsaarel välja kujunenud geneetiliselt eristunud grupp, mida mujal maailmas ei ole.

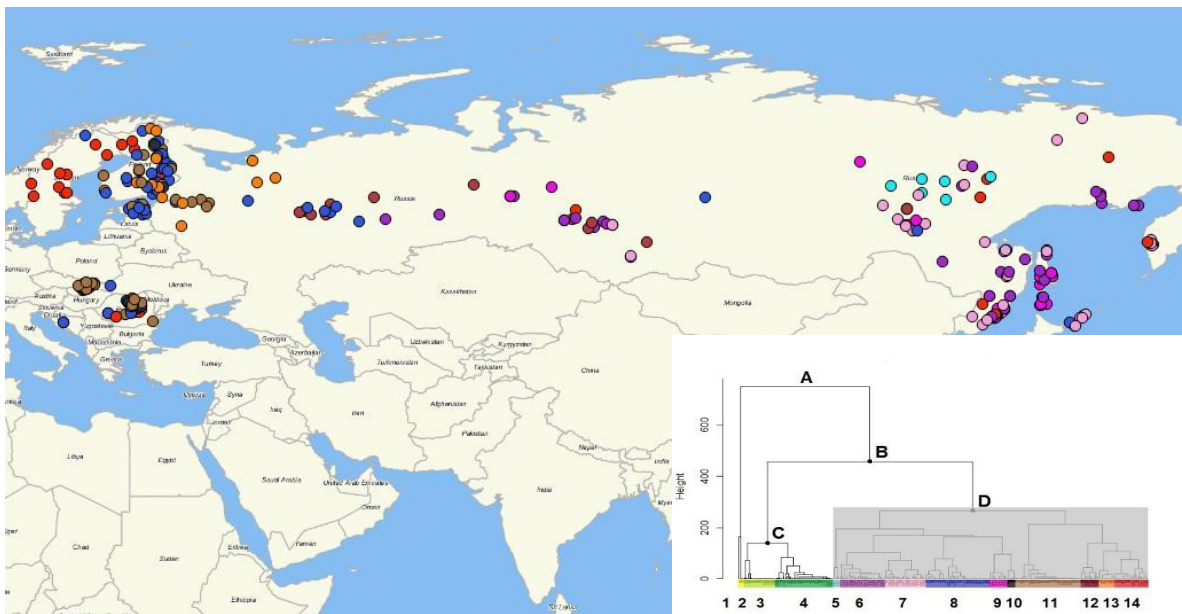


Joonis 7. Klaadi B (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klaad koosneb klastritest 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ja 14 ning on tähistatud vastavalt helerohelise, tumerohelise, helesinise, tumelilla, roosa, tumesinise, lilla, musta, pruuni, tumepunase, oranži ja punase värviga.



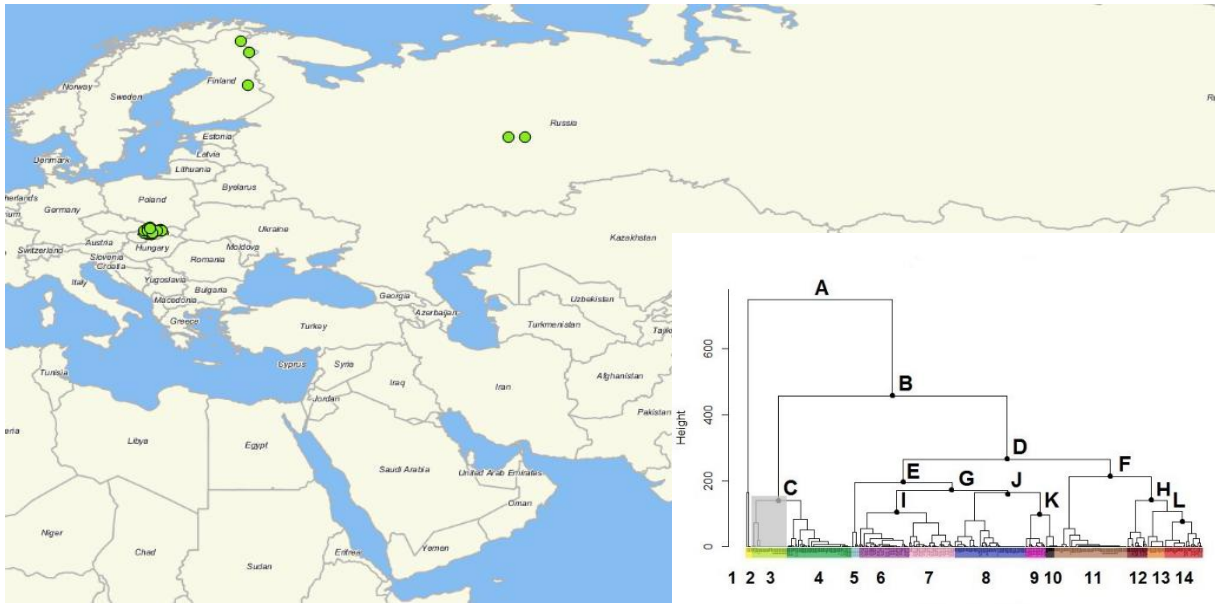
Joonis 8. Klaadi C (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klaad koosneb klastritest 3 ja 4 ning on tähistatud vastavalt helerohelise ja tumerohelise värviga.

Klaad C on ühtlaselt jaotunud kogu uurimisalal, kuid suurem enamus on Uuralitest läänepool ning Euroopas. Selle klaadi isendeid ei esine Kamtšatkal ning Iturupi ja Sahhalini saartel.



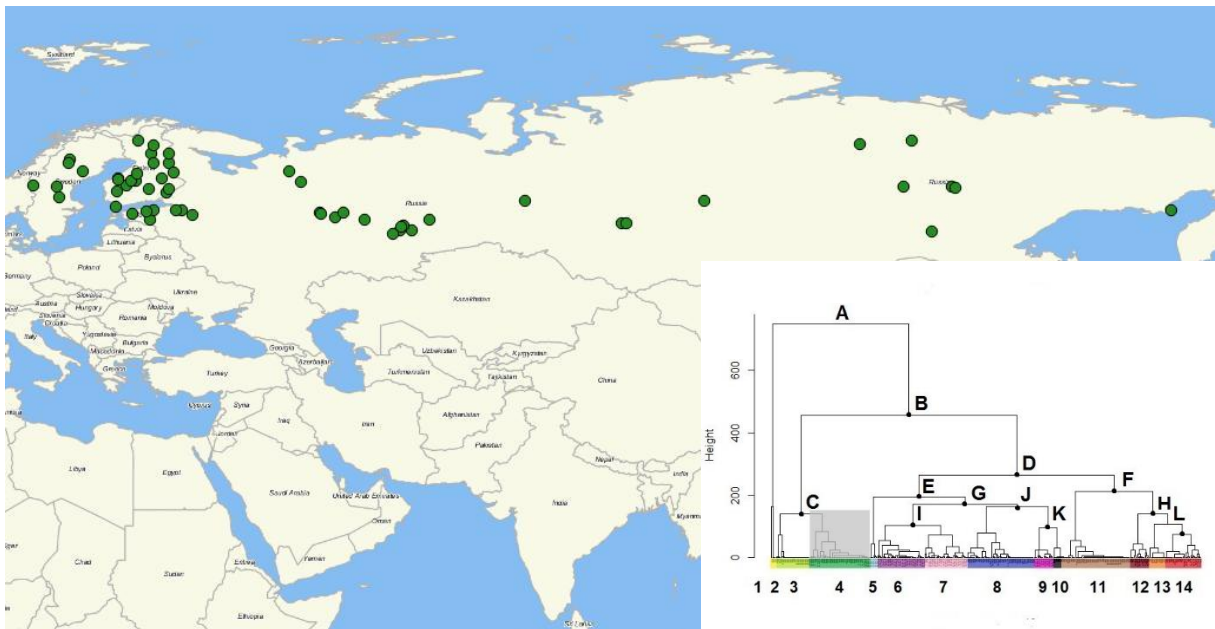
Joonis 9. Klaadi D (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klaad koosneb klastritest 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ja 14 ning on tähistatud vastavalt helesinise, tumelilla, roosa, tumesinise, lilla, musta, pruuni, tumepunase, oranži ja punase värviga.

Klaad D on samuti väga ühtlaselt jaotunud üle kogu Euraasia. Antud klaadi esindajaid leidub eranditult kõikjal uuritud piirkondades.



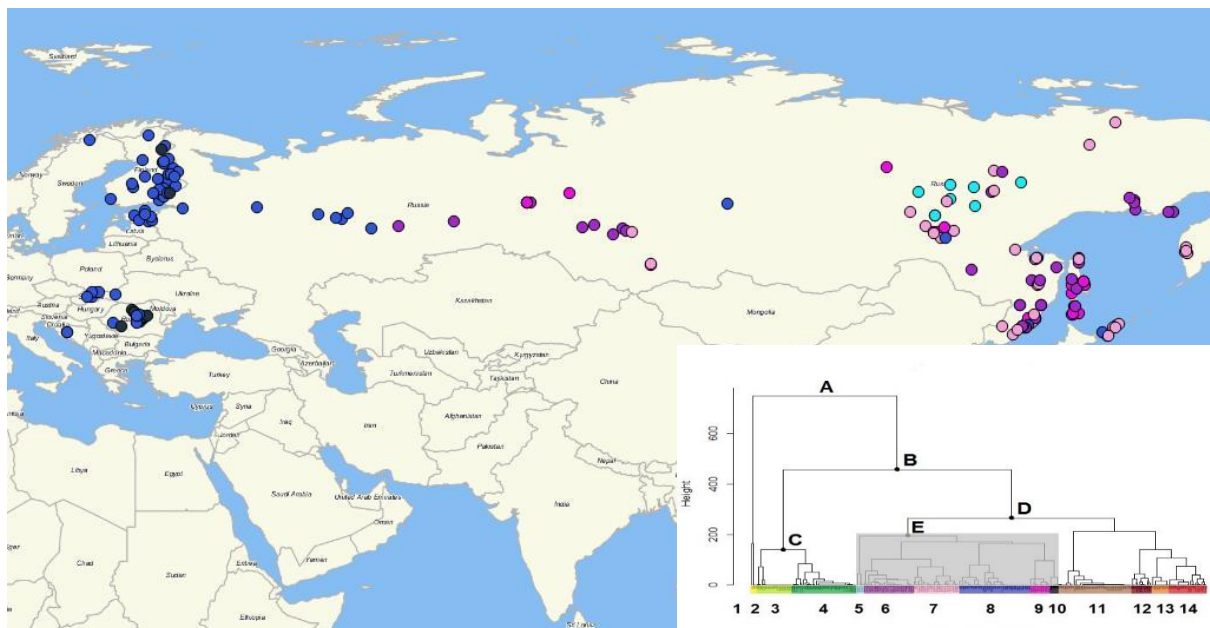
Joonis 10. Klaster number 3 (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klasteri isendid on tähistatud helerohelise värviga.

Klasteri number 3 isendeid esineb vaid Euroopas ning Venemaa läänepoolses osas. Enamik antud klasteri isendeid on paigutunud Slovakkiasse, kus suurem osa neist on ühest haplotüübist. Identse genotüübiga isendid asuvad ka Venemaal ja Soomes.



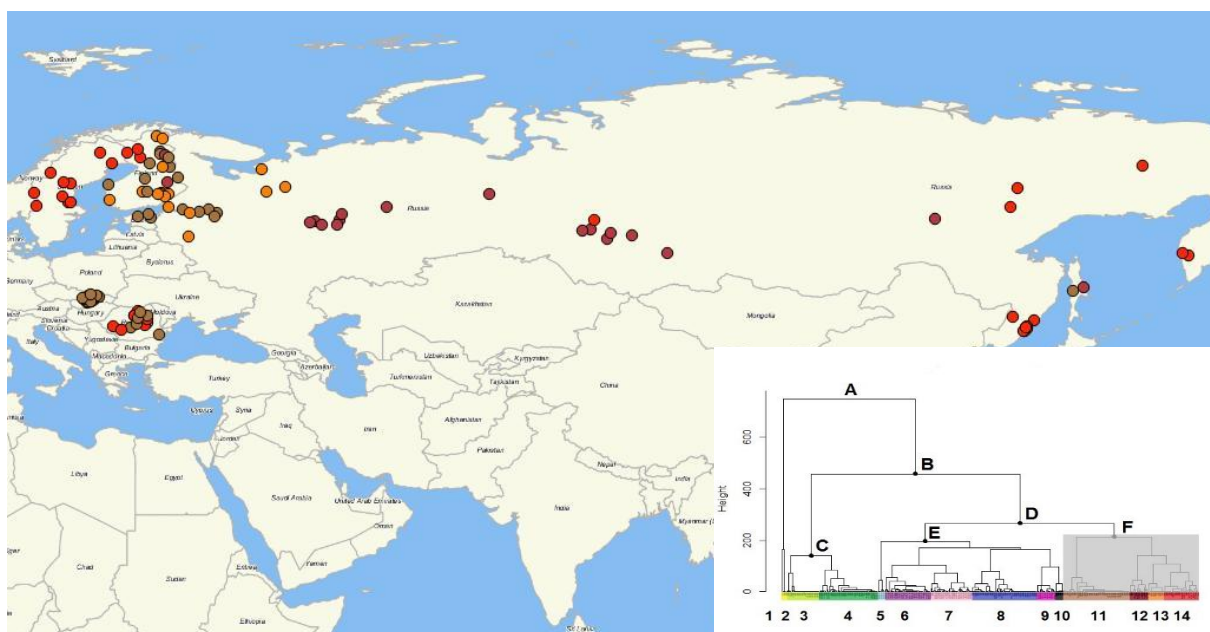
Joonis 11. Klaster number 4 (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klasteri isendid on tähistatud tumerohelise värviga.

Klaster number 4 isendid on väga laia levikuga kattes kogu uurimisala Euraasias välja arvatud Lõuna-Euroopa. Tõenäoliselt olid selle klasteri isendid refuugiumis kuskil Venemaal ja seetõttu pole jõudnud levida Lõuna-Euroopasse.



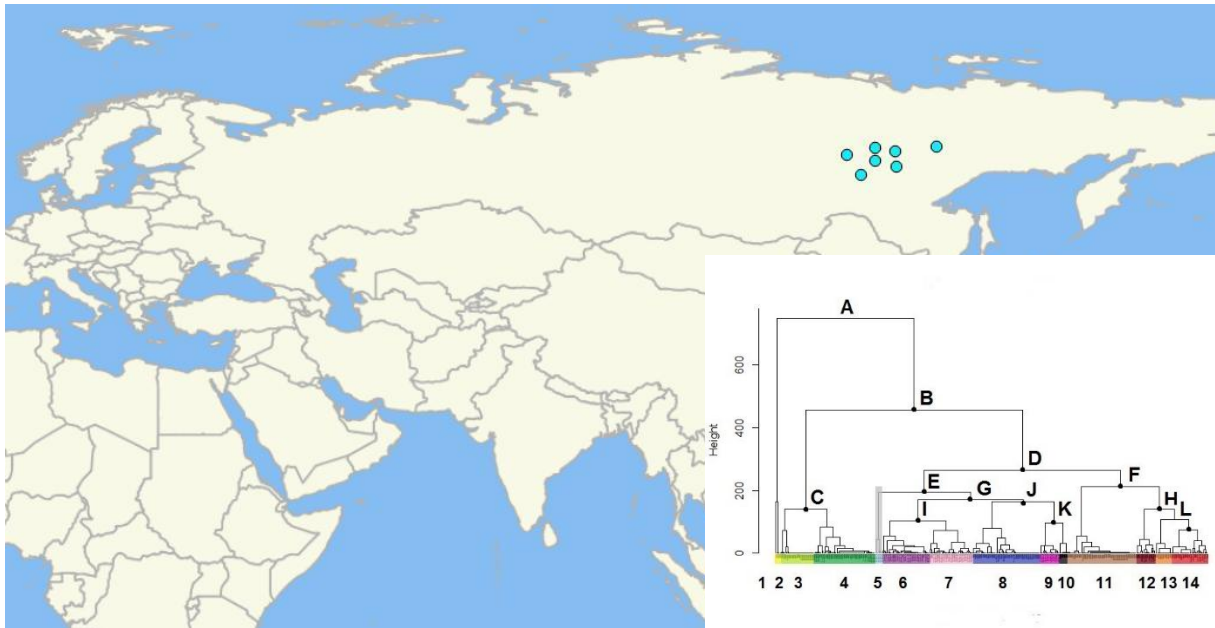
Joonis 12. Klaadi E (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klaad koosneb klastritest 5, 6, 7, 8, 9 ja 10 ning on tähistatud vastavalt helesinise, tumelilla, roosa, tumesinise, lilla ja musta värviga.

Klaad E on väga ühtlaselt jaotunud üle kogu Euraasia. Antud klaadi esindajaid leidub kõikjal uuritud piirkondades.



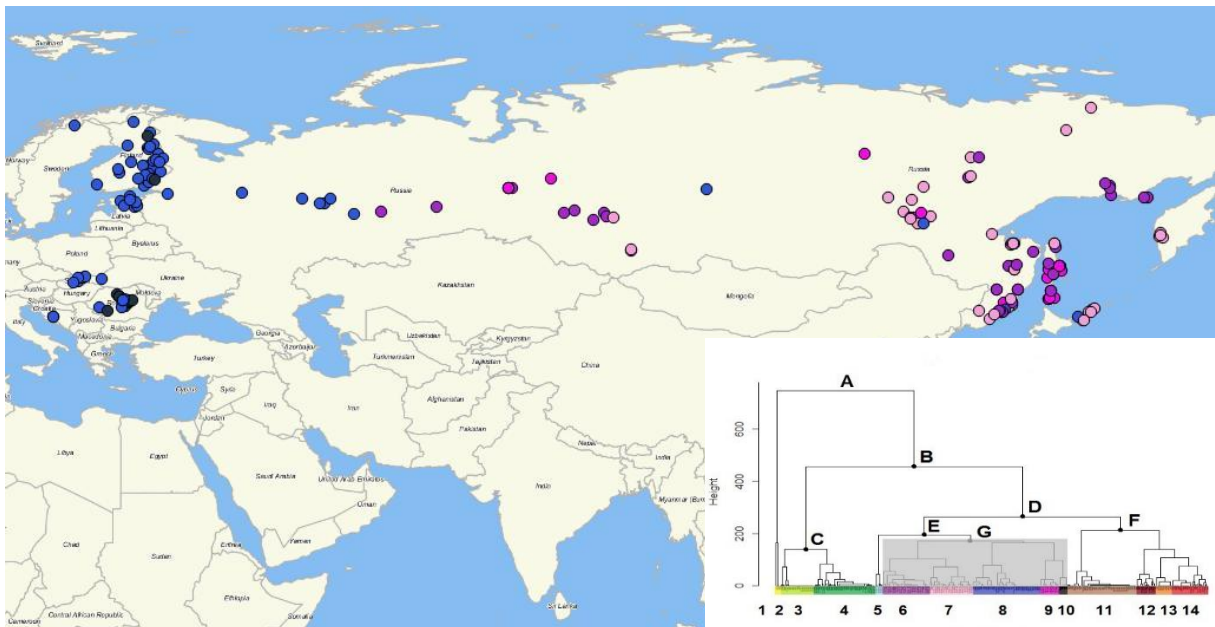
Joonis 13. Klaadi F (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klaad koosneb klastritest 11, 12, 13 ja 14 ning on tähistatud vastavalt pruuni, tumepunase, oranži ja punase värviga.

Klaad F on samuti väga ühtlaselt jaotunud üle kogu Euraasia. Antud klaadi esindajaid leidub peaaegu kõikjal uuritud piirkondades, kuid suurem enamus asuvad Uuralistest läänepool ning Euroopas.



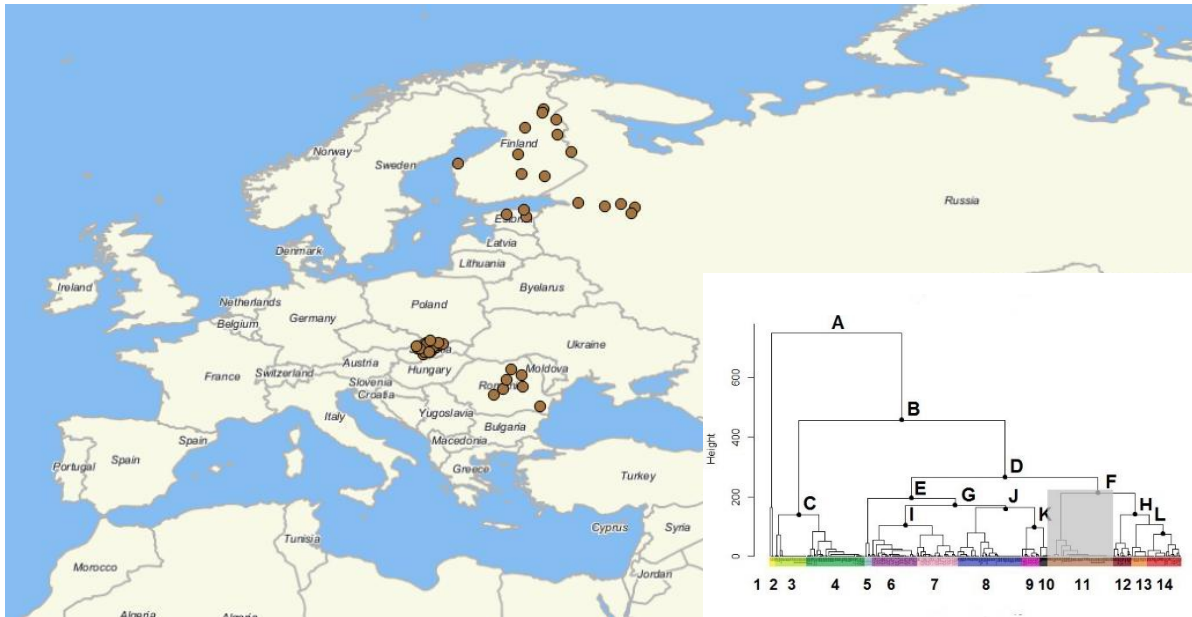
Joonis 14. Klaster number 5 (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klasteri isendid on tähistatud helesinise värviga.

Klaster number 5 on kõige kitsama levikuga kogu valimist. See klaster koosneb 7 isendist, kes kõik paiknevad Ida-Venemaal Yakutski läheduses. 7 isendi kohta on 4 haplotüüpi, seega isegi nii väikese valimiga on geneetiline mitmekesisus üsna kõrge.



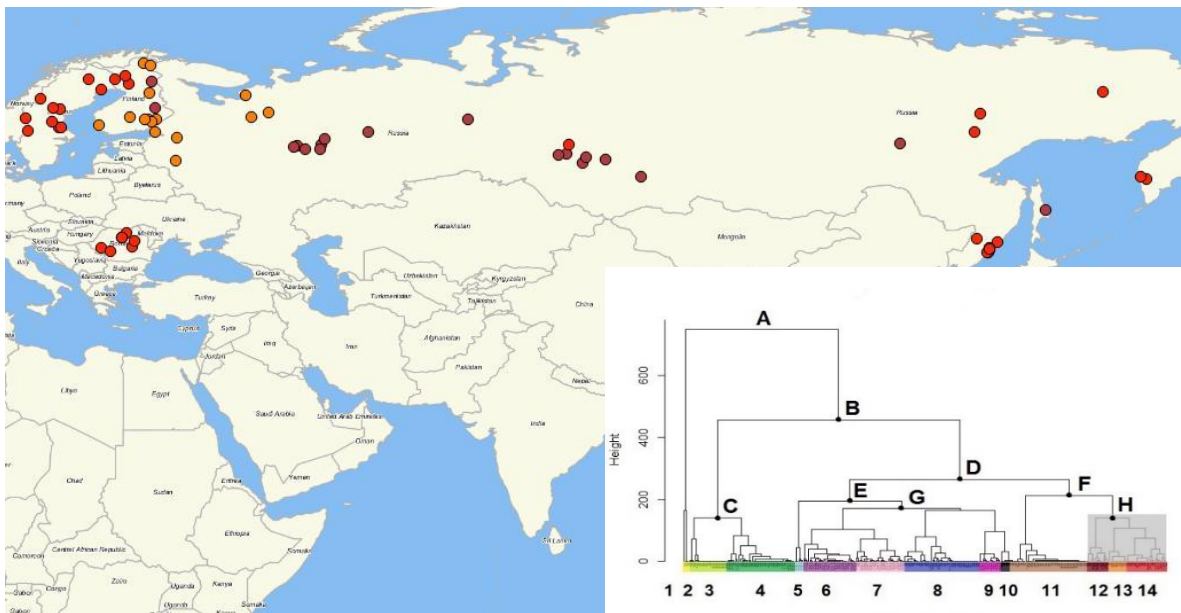
Joonis 15. Klaadi G (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klaad koosneb klasteritest 6, 7, 8, 9 ja 10 ning on tähistatud vastavalt tumelilla, roosa, tumesinise, lilla ja musta värviga.

Klaad G on väga ühtlaselt jaotunud üle kogu Euraasia. Antud klaadi esindajaid leidub kõikjal uuritud piirkondades.



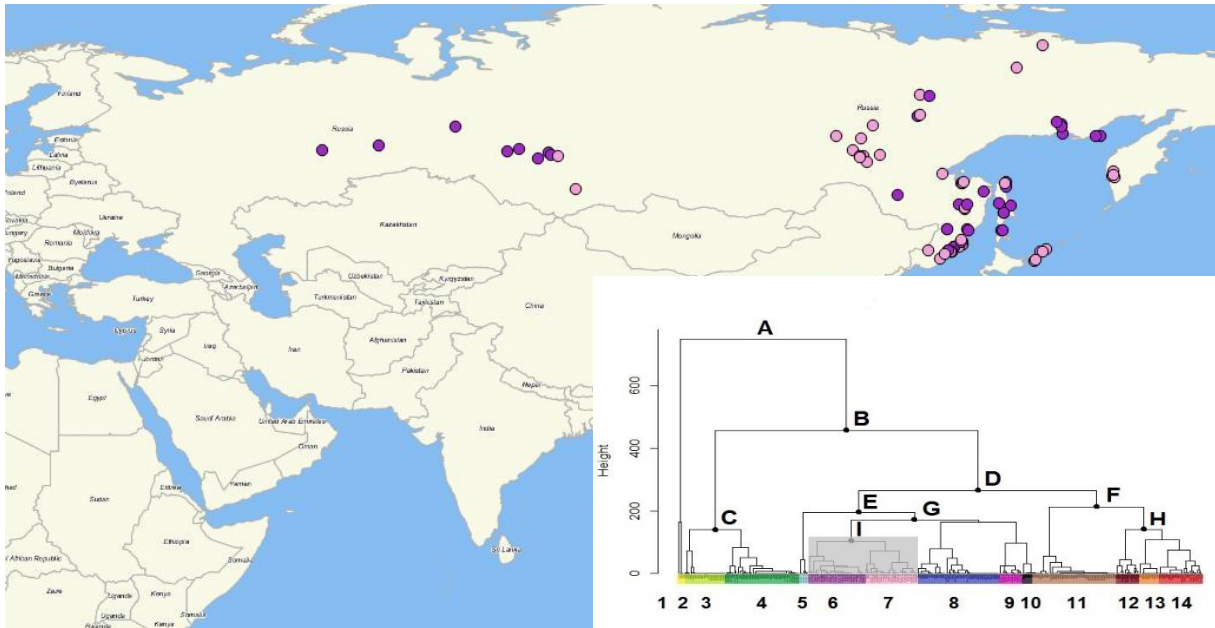
Joonis 16. Klaster number 11 (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klasteri isendid on tähistatud pruuni värviga.

Klaster number 11 on levinud Euroopas nii lõuna- kui ka põhjaaladel. Selle klasteri isendeid on Rumeenias, Slovakkias, Eestis, Soomes ja Venemaal. Kuna klasteri isendeid esineb vaid Euroopas ning kaugemale Euraasiasse pole levinud, siis selle põhjal võiks arvata, et tegemist on liiniga, mis oli refuugiumis Karpaatidest lõuna pool.



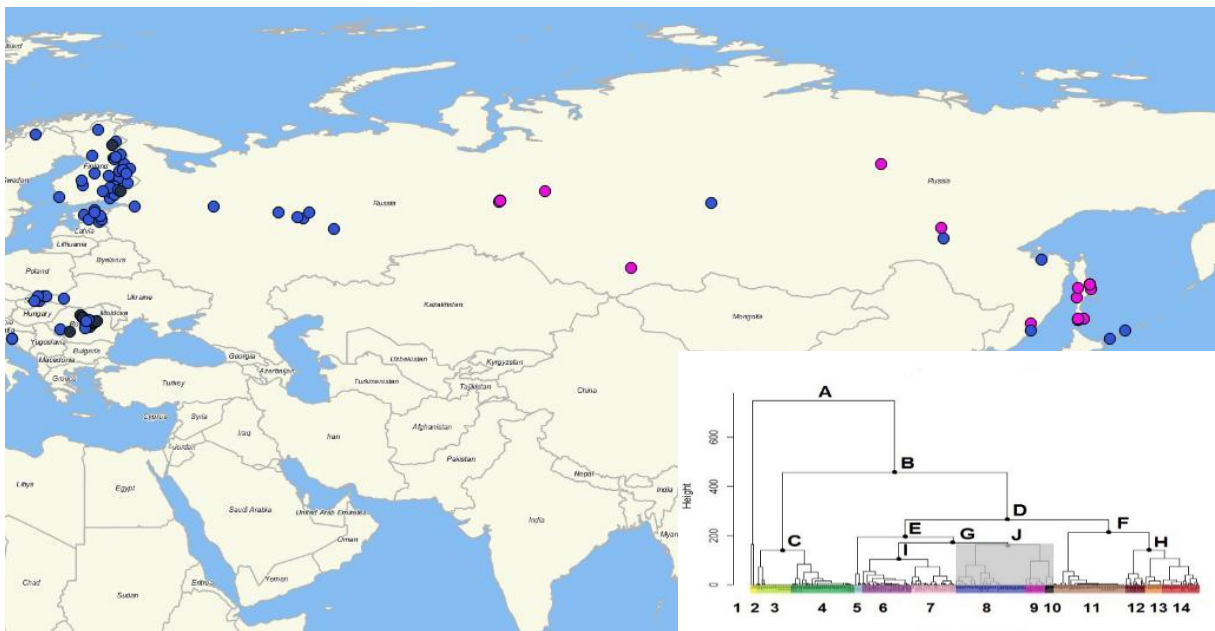
Joonis 17. Klaadi H (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klaad koosneb klasteritest 12, 13 ja 14 ning on tähistatud vastavalt tumepunase, oranži ja punase värviga.

Klaad H on küllaltki ühtlaselt jaotunud üle kogu Euraasia. Antud klasteri esindajaid leidub peaaegu kõikjal uuritud piirkondades, välja arvatud Slovakkia ning Iturupi saar.



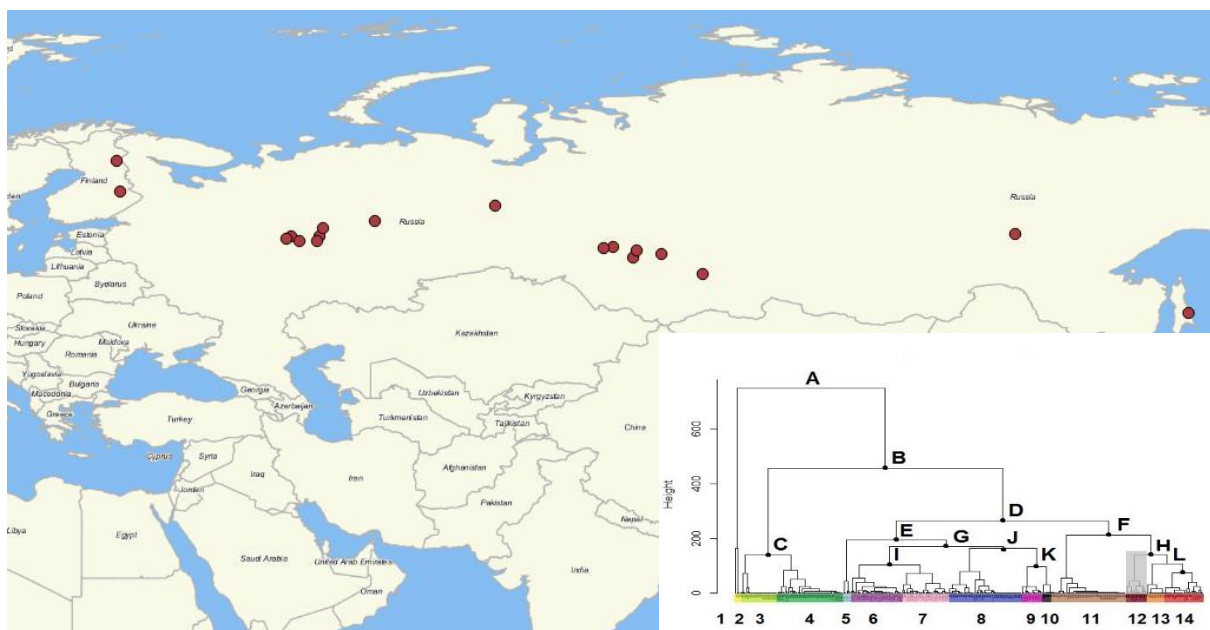
Joonis 18. Klaadi I (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klaadi koosneb klastritest 6 ja 7 ning on tähistatud vastavalt tumelilla ja roosa värviga.

Klaad I on levinud vaid Uuralitest ida pool. Selle klaadi leviku põhjal võib arvata, et Uuralid on olnud selle klaadi jaoks migratsioone takistavaks geograafiliseks barjääriks.



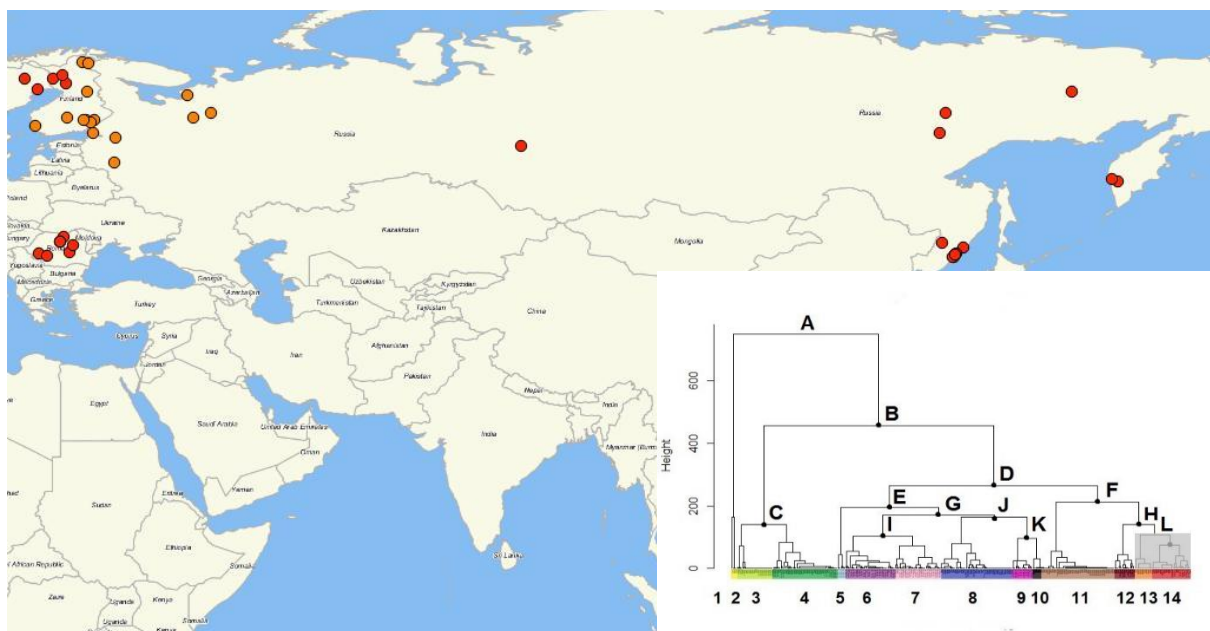
Joonis 19. Klaadi J (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klaad koosneb klastritest 8, 9 ja 10 ning on tähistatud vastavalt tumesinise, lilla ja musta värviga.

Klaadist J paiknevad 2 klastrit suures osas Uuralitest läänes, kuid samas klastri number 10 sõsarklaadi 9 isendid paiknevad üksnes Uuralitest idas ja on suhteliselt sagedasem Sahhalini saarel.



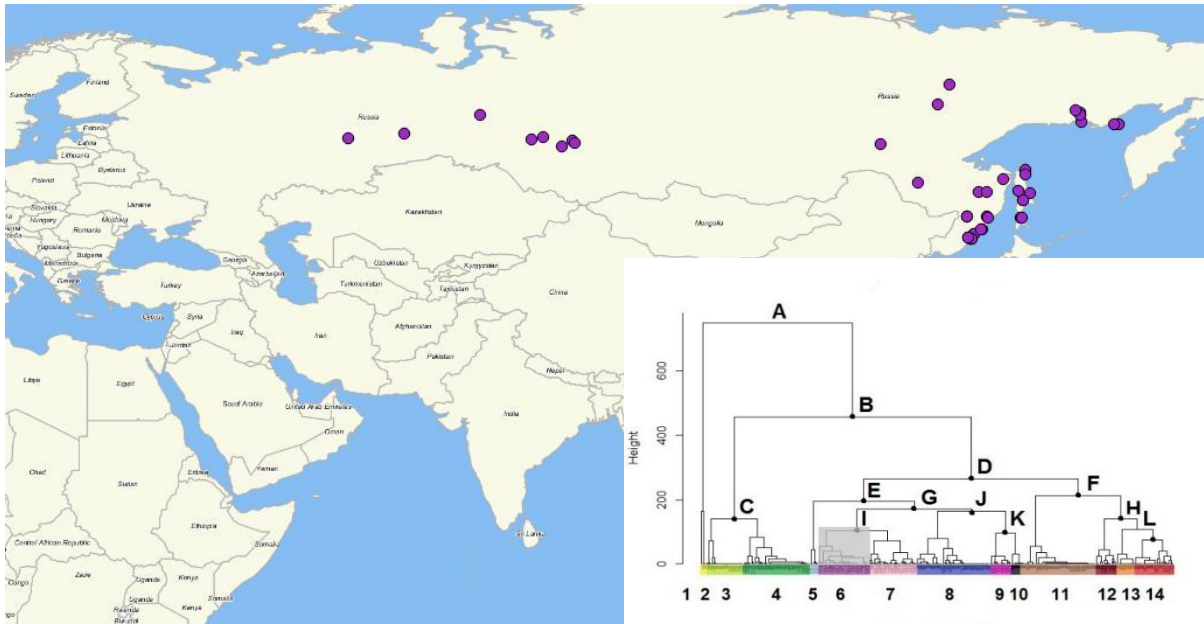
Joonis 20. Klaster number 12 (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klasteri isendid on tähistatud tumepunase värviga.

Üle kogu Euraasia levinud klaster, välja arvatud Lõuna-Euroopa, Eesti ja Rootsi. Selle klasteri geograafilise leviku põhjal võib arvata, et antud klaster oli refuugiumis idapool, sest Euroopasse on klaster levinud vaid Ida-Soome.



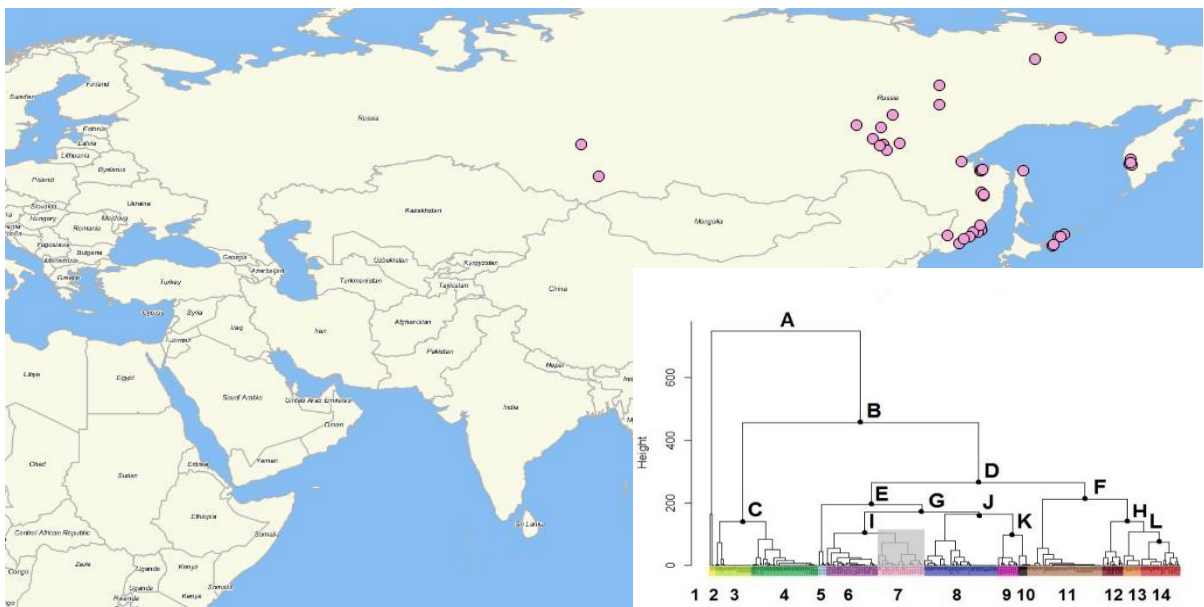
Joonis 21. Klaadi L (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klaad koosneb klasteritest 13 ja 14 ning on tähistatud oranži ja punase värviga.

Klaad L on jaotunud üle kogu Euraasia, kuid valdav enamus paiknevad Euroopas.



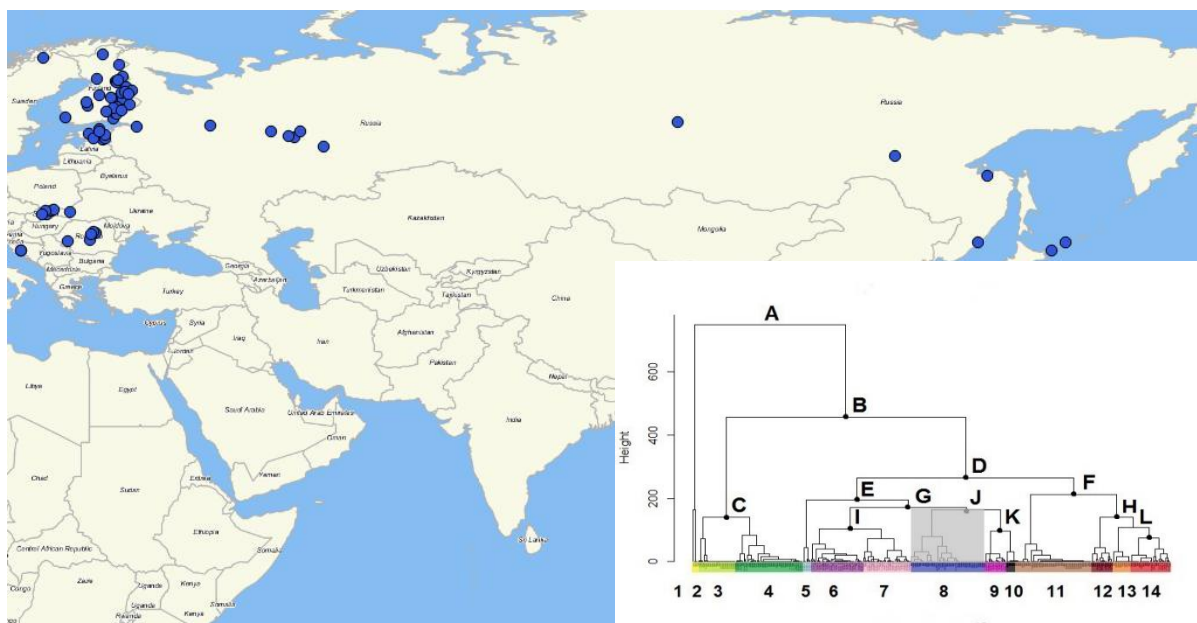
Joonis 22. Klaster number 6 (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klasteri isendid on tähistatud tumelilla värviga.

Klasteri number 6 isendid on levinud Venemaal Uurali mäestikust idapoolsele jääval alal. Ühe karu asukohaks on märgitud punkt, mis jääb täpselt Uurali mäestikusse ning veidi sellest isegi läänepoolsele. See näitab, et Uurali mäestik pole isaskarude jaoks ületamatu geograafiline barjäär ning selle ületamist esineb.



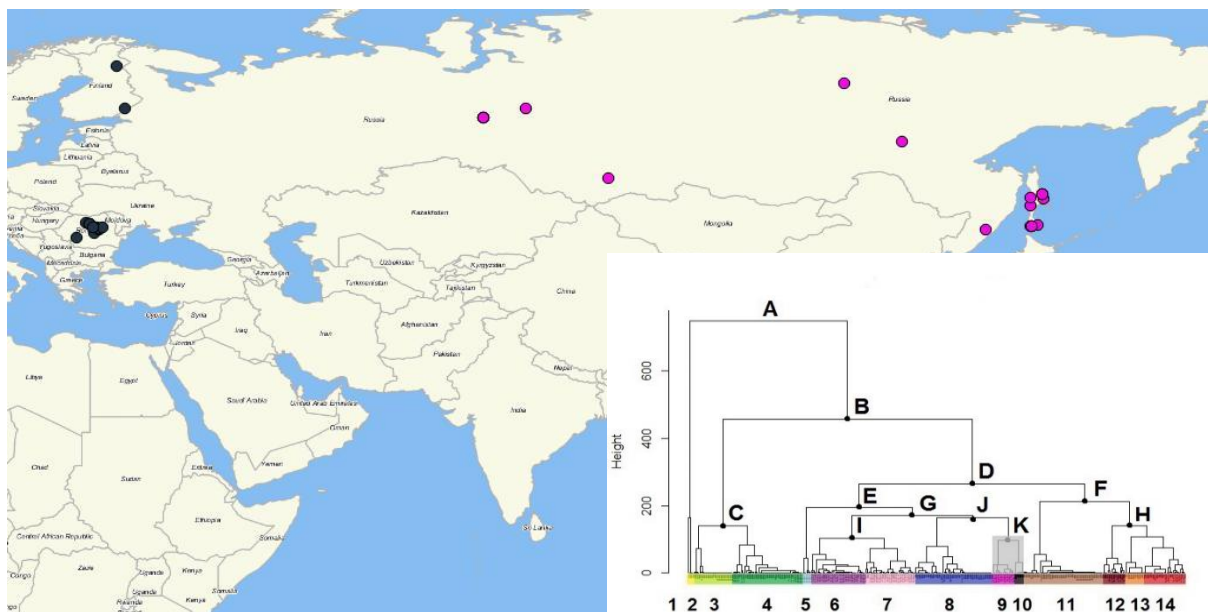
Joonis 23. Klaster number 7 (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klasteri isendid on tähistatud roosa värviga.

Klaster number 7 on levinud ainult Kaug-Idas mõne üksiku erandiga. Seda esineb ka Kamtšatkal ning Iturupi ja Sahhalini saartel.



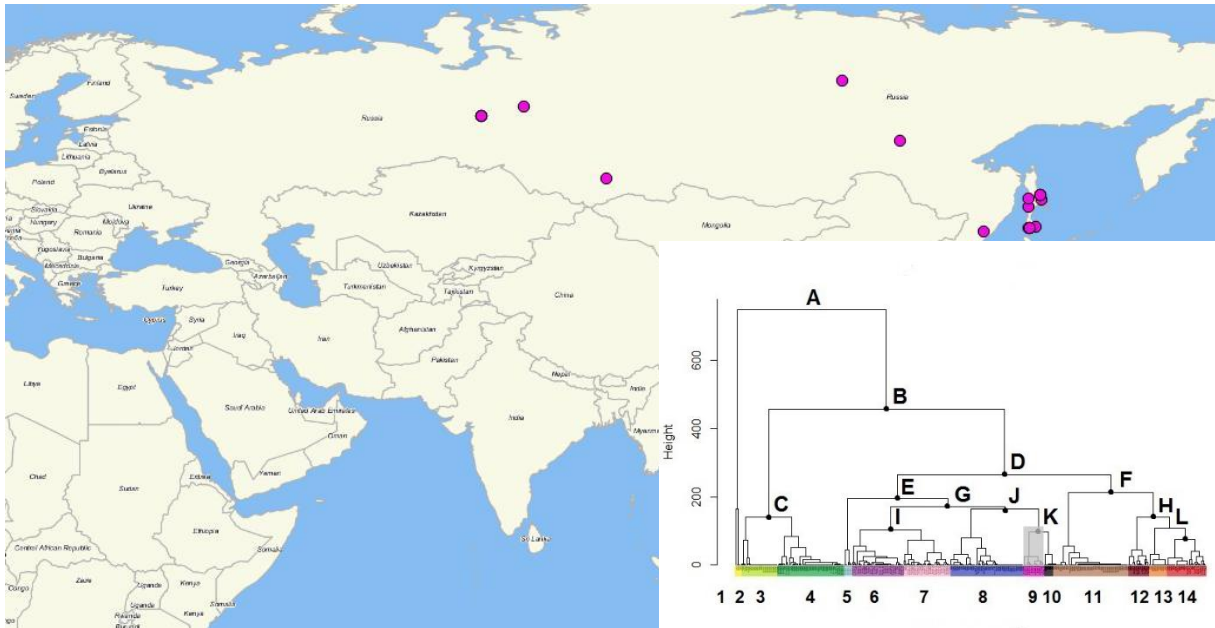
Joonis 24. Klaster number 8 (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klasteri isendid on tähistatud tumesinisise värviga.

Klaster number 8 on väga laia levikuga, asustades kogu Euraasia uurimisala. Üksikute isendite kaupa esineb kõikides uuritud riikides, kuid eriti palju on selle klasteri esindajaid Slovakkias, Rumeenias, Soomes ja Eestis.



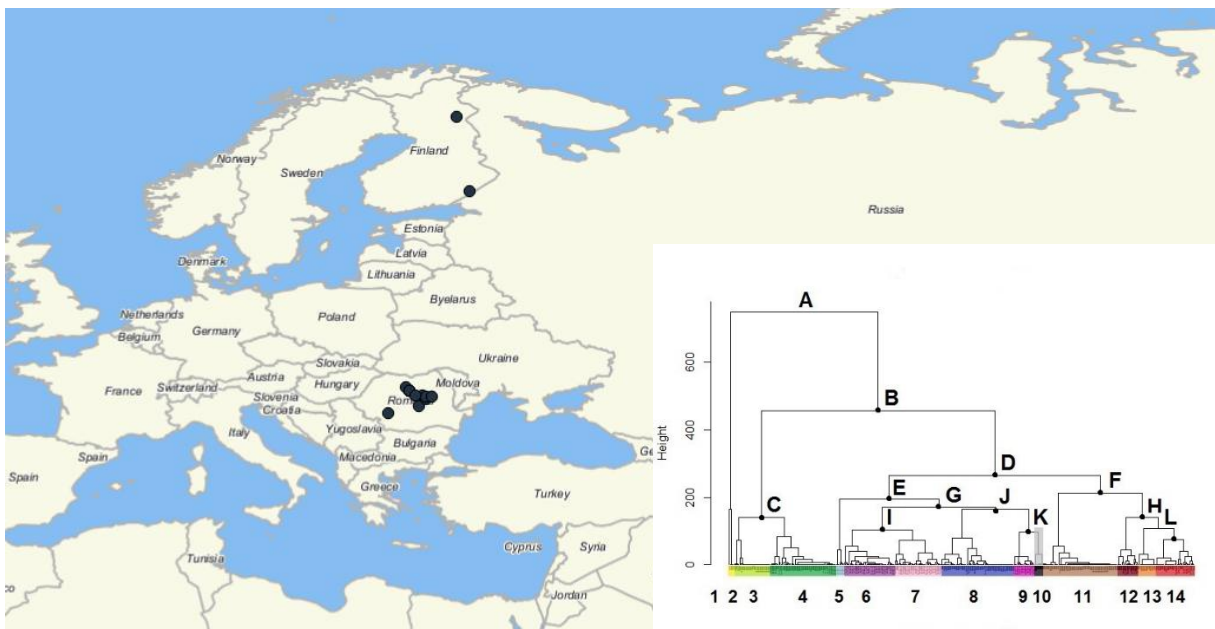
Joonis 25. Klaadi K (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klaad koosneb klasteritest 9 ja 10 ning on tähistatud vastavalt lilla ja musta värviga.

Klaad K on väga laia levikuga üle kogu Euraasia. Üks sõsarklaad on kitsalt levinud vaid Rootsis ja Rumeenias ning teine peamiselt teisel pool uurimisala otsas Sahhalini saarel. Üksikud isendid asuvad ka kahe sõsarklaadi keskel Kesk-Venemaal.



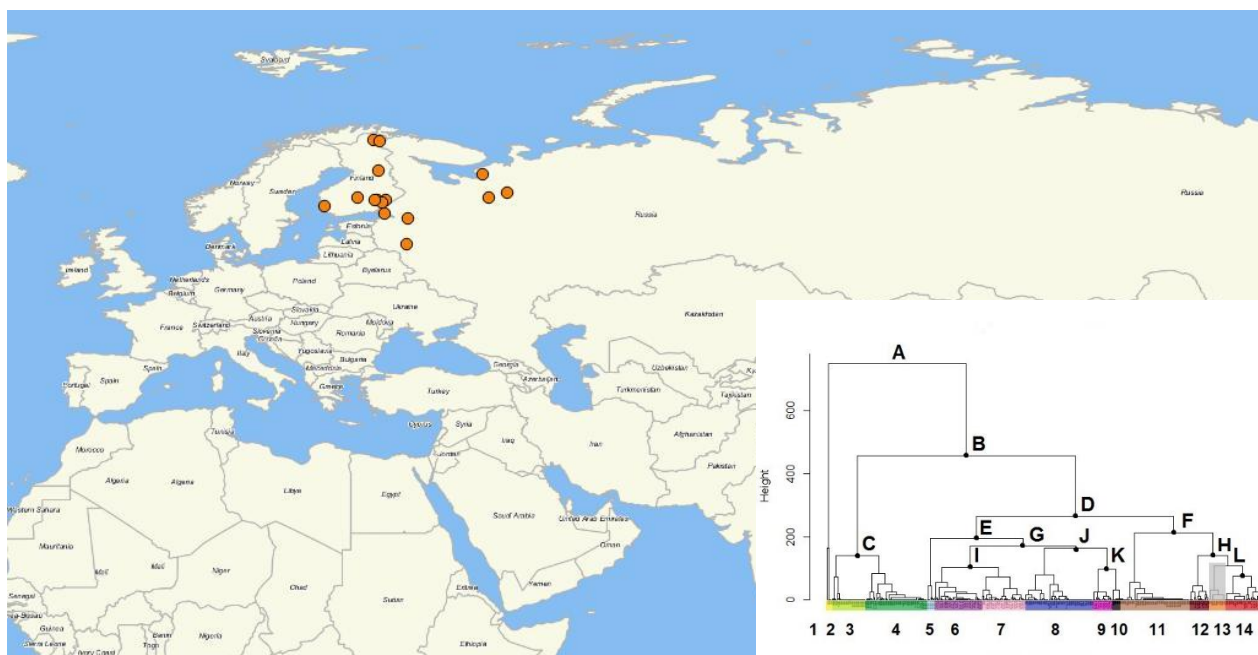
Joonis 26. Klaster number 9 (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klasteri isendid on tähistatud lilla värviga.

Klaster number 9 on levinud Venemaal Urali mäestikust idapoole jääval alal. Klasteri isendeid esineb ka Altai mäestikus ja Sahhalini saarel, kuid Kamtšatka poolsaarel mitte.



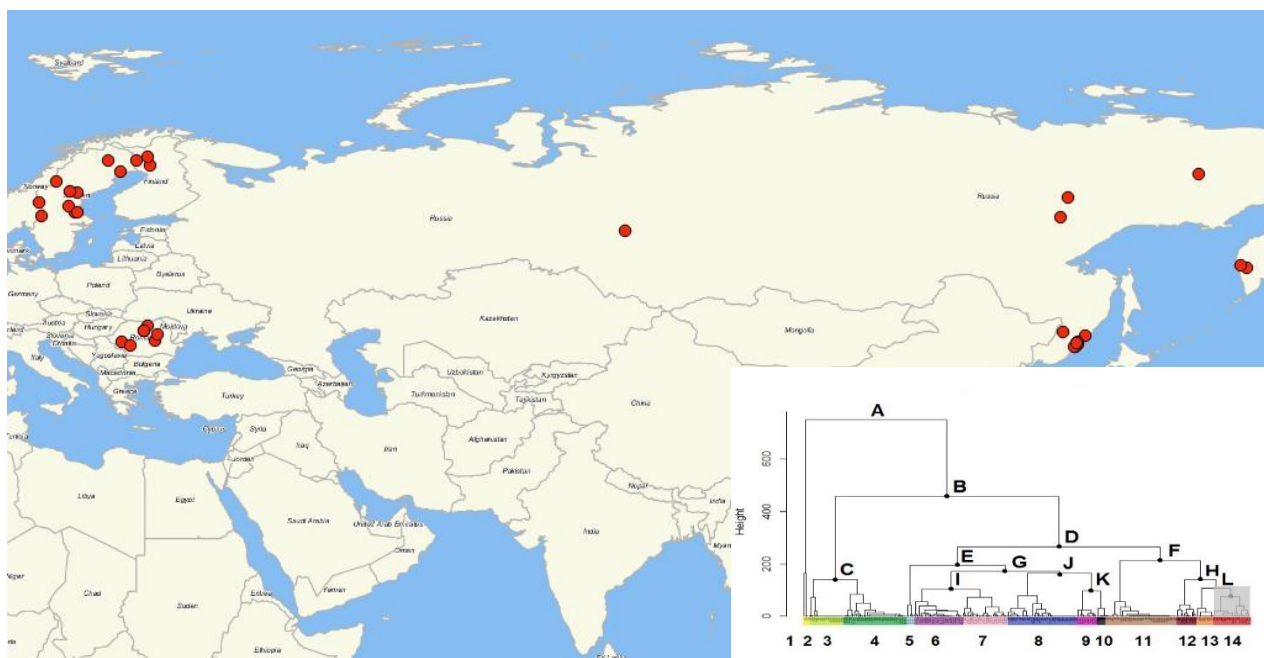
Joonis 27. Klaster number 10 (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klasteri isendid on tähistatud musta värviga.

Klaster number 10 isendeid esineb ainult Euroopas Soomes ja Rumeenias. Rumeenias on kaks eri haplotüüpi ning Soomes kaks haplotüüpi, mida Rumeenias pole.



Joonis 28. Klaster number 13 (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klasteri isendid on tähistatud oranži värviga.

Klasterit number 13 esineb ainult Põhja-Euroopas Soomes ja Lääne-Venemaal. Tegemist on üsna kitsa levikuga klasteriga.



Joonis 29. Klaster number 14 (fülogeneesipuul halli värviga) geograafiline levik. Klasteri isendid on tähistatud punase värviga.

Klaster number 14 on väga laia levikuga üle kogu Euraasia. Üks isend asub Kesk-Venemaal ning mõned Ida-Venemaal ja Kamtšatkal. Suurem enamus 14. klasterisse

paigutunud karudest asuvad Euroopas. Huvitav on see, et antud klasteri isendeid leidub Rumeenias ja Rootsis, kuid ülejäänud Euroopas mitte.

Tabel 2. Genotüübilise mitmekesisuse võrdlus 14 klasteri kaupa. Pop- populatsiooni nimetus; N- proovide arv; MLG- genotüüpide arv; eMLG- oodatav MLG väikseima valimi puhul ≥ 10 ; SE- standardhälve eMLG põhjal; H- Shannon-Wieneri MLG mitmekesisuse indeks; G- Stoddart & Tayloriga MLG mitmekesisuse indeks; lambda- Simpsoni indeks; E.5- genotüübiline ühtlus; NA- puuduv andmestik

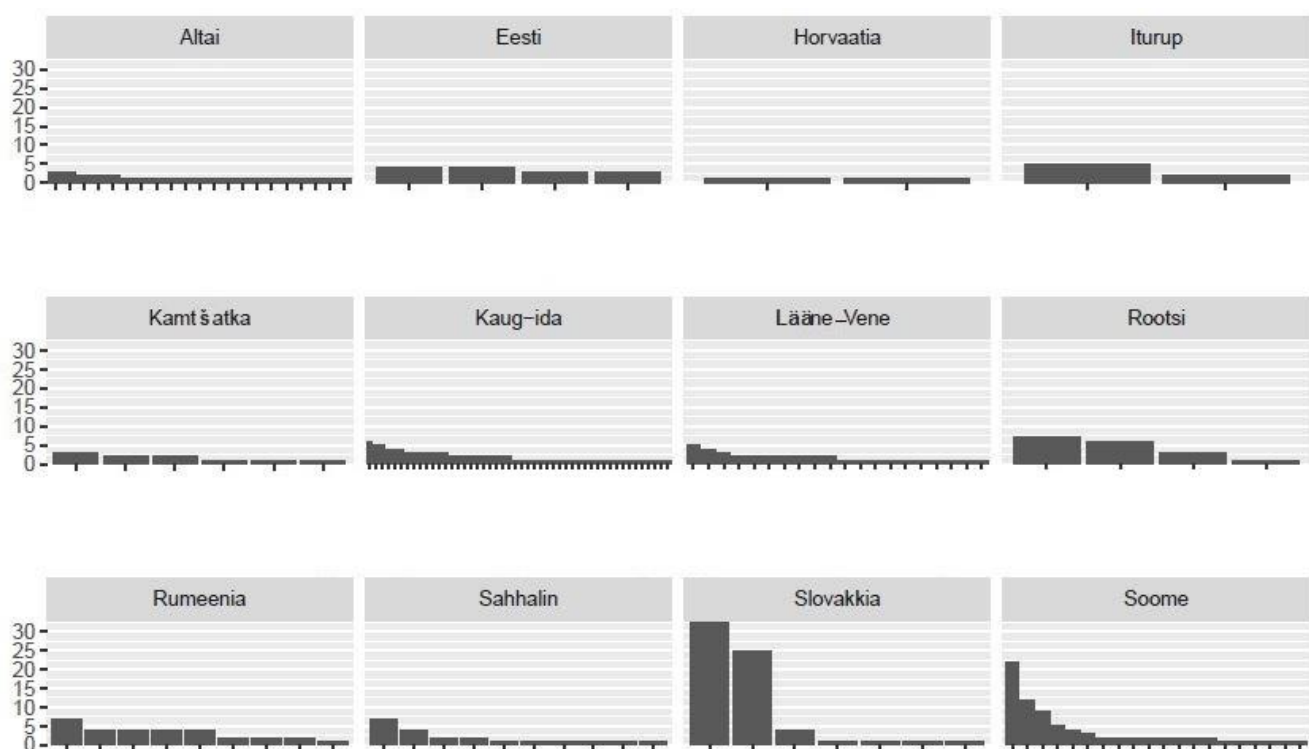
Pop	N	MLG	eMLG	SE	H	G	lambda	E.5
Pop1	1	1	1	0	0	1	0	NA
Pop2	3	1	1	0	0	1	0	NA
Pop3	32	4	2,54	0,78	0,67	1,48	0,33	0,50
Pop4	57	15	5,71	1,24	2,06	4,46	0,78	0,51
Pop5	7	4	4	0	1,28	3,27	0,69	0,88
Pop6	44	16	6,84	1,19	2,40	7,56	0,87	0,66
Pop7	40	19	8,13	1,02	2,78	14,04	0,93	0,86
Pop8	64	18	6,21	1,26	2,28	5,67	0,82	0,53
Pop9	17	9	6,45	0,97	1,99	6,15	0,84	0,82
Pop10	13	3	2,96	0,19	0,98	2,45	0,59	0,87
Pop11	58	6	3,68	0,91	1,22	2,37	0,58	0,58
Pop12	18	9	6,63	0,92	2,04	6,75	0,85	0,86
Pop13	15	3	2,81	0,40	0,76	1,74	0,43	0,65
Pop14	34	13	6,39	1,17	2,20	6,57	0,85	0,70
Kokku	403	120	9,03	0,93	4,22	36,70	0,97	0,54

Kõige kõrgema genotüübilise mitmekesisusega on klaster 7 (eMLG= 8,13), mis on levinud peamiselt Ida-Venemaa ning ka kaks isendit Altai piirkonnas. Madalaim mitmekesisus on klasteris number 3 (eMLG=2,54), mis on levinud Soomes, Lääne-Venemaal ning kõige arvukamalt Slovakkias. Tõenäoliselt on selle klasteri madala mitmekesisuse põhjuseks Slovakkias aset leidnud tõsine pudelikael, mis on põhjustanud selle piirkonna karupopulatsiooni arvestatavat geneetilise mitmekesisuse langust.

Tabel 3. Genotüübilise mitmekesisuse võrdlus 12 võrreldud piirkonna kaupa. Pop- populatsiooni nimetus; N- proovide arv; MLG- genotüüpide arv; eMLG- oodatav MLG väikseima valimi puhul ≥ 10 ; SE- standardhälve eMLG põhjal; H- Shannon-Wieneri MLG mitmekesisuse indeks; G- Stoddart & Tayloriga MLG mitmekesisuse indeks; lambda- Simpsoni indeks; E.5- genotüübiline ühtlus.

Pop	N	MLG	eMLG	SE	H	G	lambda	E.5
Altai	28	21	9	0,84	2,95	17,04	0,94	0,89
Eesti	14	4	3,98	0,15	1,38	3,92	0,74	0,99
Horvaatia	2	2	2	0	0,69	2	0,50	1
Iturup	7	2	2	0	0,60	1,69	0,41	0,84
Kamtšatka	10	6	6	0	1,70	5	0,80	0,90
Kaug-Ida	94	48	9,19	0,81	3,69	33,73	0,97	0,84
Lääne- Vene	36	20	8,37	1,00	2,84	14,73	0,93	0,85
Rootsi	17	4	3,54	0,53	1,21	3,04	0,67	0,87
Rumeenia	31	10	6,49	0,99	2,14	7,57	0,87	0,87
Sahhalin	21	10	6,28	1,06	2,00	5,58	0,82	0,72
Slovakkia	66	7	3,09	0,84	1,14	2,51	0,60	0,71
Soome	77	20	6,57	1,25	2,45	7,44	0,87	0,61
Kokku	403	120	9,05	0,91	4,23	37,69	0,97	0,54

Kõige suurem genotüüpide mitmekesisus on Kaug-Idas (eMLG= 9,19) ja kõige madalam Slovakkias (eMLG= 3,09). Keskmise oodatav genotüüpide mitmekesisus üle kogu Euraasia on 9,05.



Joonis 30. Joonisel on kujutatud genotüübilist ühtlust (*genotypic evenness*) 12 erineva piirkonna siseselt. Y-teljel on kujutatud isendite arv ja x-teljel genotüübid.

Genotüübiline ühtlus näitab, milliseid genotüüpe on populatsioonis rohkem ja milliseid vähem. Populatsioonis, kus kõiki genotüüpe on täpselt sama palju, võrdub genotüübiline ühtlus ühega ($E.5 = 1$). Genotüübiliselt kõige ühtlasemad populatsioonid on Eesti ($E.5 = 0,99$) ja Horvaatia ($E.5 = 1$). Kuid Horvaatia populatsiooni kohta saadud tulemused suure tõenäosusega ei väljenda reaalset sealse karupopulatsiooni olukorda, sest valim on liiga väike ($n = 2$). Korrektsemate tulemuste saamiseks Horvaatia kohta tuleks edaspidistes uuringutes kindlasti valimit suurendada. Juhul, kui genotüübilise ühtluse väärtus on arvestatavalt madalam kui 1, siis pole populatsioon genotüübiliselt ühtlane, mis tähendab, et mõnda genotüüpi on palju rohkem kui teisi. See omakorda põhjustab geneetilise mitmekesisuse langust, nagu see on Slovakkias ($E.5 = 0,71$) ja Soomes ($E.5 = 0,61$).

5. Arutelu

Kogu valim jagati lisaks 14 geneetilise sarnasuse põhjal jaotunud klastrile ka 12 piirkonnaks ning võrreldi neid piirkondi, et saada ülevaade piirkonnasisesest mitmekesisusest. Enamike piirkondade aluseks on riigipiirid. Kõik karupopulatsioonid kindlasti ei piirdu vaid riigipiiridega, kuid tänapäeval toimub ulukite majandamine just riigipiiride alusel ning seetõttu leidsime, et selliseid kunstlikke piire on mõistlik tõmmata, et oleks võimalik saada ülevaatlik pilt, mis seisukorras on karupopulatsioonid riigiti. Kuna Venemaa on väga suur haldusüksus, siis oli vajalik see riik omakorda jaotada riigisisesteks piirkondadeks: Altai, Iturupi ja Sahhalini saared, Kamtšatka poolsaar, Uuralitest läänepoolse jääv Venemaa osa ning Kaug-Ida piirkond. Enamasti määrasid nende alade piirid geograafilised barjäärid. Kuid erand on Altai piirkond, mida analüüsisime eraldi, et kontrollida varem kirjanduses püstitatud hüpoteesi, et seal võis asuda refuugium (Anijalg *et al.* avaldamata andmed) .

Tulemused toovad välja, et märkimisväärselt madal Y-kromosoomi genotüübiline mitmekesisus on Slovakkias ja Rootsis. Need tulemused on seletatavad hiljuti toimunud sündmustega, sest nii Slovakkia kui ka Rootsi karupopulatsioonid on läbinud geneetilise pudelikaela. Tänapäevaks on nende populatsioonide arvukus tõusnud, kuid madal Y-kromosoomi mitmekesisus viitab sellele, et populatsioonid ei ole veel täielikult taastunud. Sellised madala geneetilise mitmekesisusega populatsioonid võivad olla ohus erinevate keskkonahäiringute esinemisel. Populatsioone mõjutavateks häiringuteks võivad olla näiteks elupaiga fragmenteerumine, üleküttimine ja haigused. Suure geneetilise mitmekesisusega populatsioonid on paindlikumad keskkonnamuutuste puhul, sest populatsioonis esineb varieeruvust. Erineva genotüübiga isendid reageerivad muutustele erinevalt, kuid kui mõjutatavas populatsioonis on suurem enamus väga sarnase genotüübiga, siis võib juhtuda, et laiaulatuslik häiring on laastav kogu populatsioonile. Mida mitmekesisem on populatsioon, seda suurem on võimalus, et häiringu korral osa populatsioonist säilib.

Töös uuritud aladest suurim Y-kromosoomi genotüübiline mitmekesisus on Kaug-Ida piirkonnas. Sellel võib olla mitmeid põhjuseid. Üheks põhjuseks võib olla asjaolu, et antud piirkonnas on inimasustus kordades madalam, kui seda on Euroopas. Kaug-Idas on metsaga kaetud alasid palju rohkem ja seetõttu on ka rohkem elupaiku. Euroopa karupopulatsioonid on fragmenteerunud ja metsloomad on sunnitud elama üsna väikestel territooriumitel, sest inimasustus ja laialdane lageraie vähendab elupaiku. Seevastu Kaug-

Ida populatsioonid eraldavad enamasti vaid looduslikud barjäärid ning populatsioonid on rohkem omavahel ühenduses ning suured ja omavahel ühenduses populatsioonid toetavad suurema geneetilise mitmekesisuse püsimist.

19. sajandi keskel oli Slovakkia karupopulatsioon mitme aastakümne kõige halvemas seisus. Esile oli tõusnud väga suur konflikt inimeste ja karude vahel ning seetõttu tapeti karusid kõikidel võimalikel viisidel. Karude hukkamine oli ametlikult premeeritud tegevus ning see viis kiirelt karupopulatsiooni languseni. Slovakkia karupopulatsiooni kõige madalam punkt saavutati 1932. aastal kui arvatav arvukus võis olla paarkümmend isendit. Peale seda võeti kasutusele kaitsekorralduslikud meetmed, et Slovakkia karupopulatsioon täiesti välja ei sureks. 1958-st kuni 80ndateni keskendusid jahimehed suurte täiskasvanud loomade kütamisele, nende seas eriti isastele ning seega oli kõige suurem jahisurve just sigimisvõimelises eas olevatele isasloomadele (Štofik *et al.* 2013) ning selline tegevus on viinud Y-kromosoomi mitmekesisuse suure languseni.

Karupopulatsioon jagunes kaheks: väiksem Lääne-Karpaatia ja suurem Ida-Karpaatia populatsioon. Ida-Karpaatia populatsioon ulatub Rumeeniasse, Ukrainasse ja Kirde-Slovakkiasse. Rumeenias oli karupopulatsiooni madalam arvukus 1950. aastatel umbes 860 isendiga. Peale seda võeti kasutusele aktiivsed kaitsekorralduslikud meetmed ning populatsioon saavutas maksimumi 1988. aastal 8000 isendi näol. Arvatakse, et Lääne- ja Ida-Karpaatia populatsioonid on omavahel olnud eraldatud alates I maailmasõjast, kuid on ka arvamusi, et 1980ndatest on karupopulatsioonid kohati olnud seotud läbi Poola territooriumi (Straka *et al.* 2012).

Antud magistr töö tulemused toetavad eelpool kirjeldatud töid. Slovakkia karupopulatsioonides esinenud pudelikael on ka Y-kromosoomi tulemustes hästi näha. Slovakkia populatsioonis esineb vaid kolm erinevat klastrit (3, 8 ja 11) ning Y-kromosoomi geneetiline mitmekesisus on silmapaistvalt madal (eMLG= 3,09). Seevastu lähedal asuv Rumeenia populatsioon on Slovakkia populatsioonist väga erinev, kuna seal pole esinenud sellist kriitiliselt madalat arvukust, nagu Slovakkias. Rumeenia isaskarude geneetiline mitmekesisus on arvestatavalt kõrgem (eMLG= 6,49) kui Slovakkias.

Klaster 3 esineb Slovakkias väga arvukalt, kuid Rumeenias selle klasteri esindajaid pole (joonis 31). Klaster 8 esineb aga Horvaatias, Slovakkias ja Rumeenias ja klaster 11 nii Slovakkias kui ka Rumeenias. Seega võib järeldada, et Rumeenia ja Slovakkia populatsioonide vahel siiski esineb mingil määral isasloomade geenivool.

Lisaks jagunes Lääne-Karpaatia populatsioon Straka ja teiste (2012) töö põhjal omakorda põhjapoolseks ja Kesk-Slovakkia grupiks. Põhjuseks peeti Váh jõe orgu ja seda, et seal on palju põllumajandusmaad, lisaks raud- ja kiirtee. Kuid meie Y-kromosoomi tulemused sellist jaotumist ei näita. Sama haplotüübiga isaseid karusid esineb mõlemal pool Váh'i jõe orgu. Tõenäoliselt pole isaskarude jaoks Váh'i jõe org nii suureks liikumisbarjääriks kui emaste jaoks, kellele pole iseloomulik väga suurte vahemaade läbimine.



Joonis 31. Slovakkia, Horvaatia ja Rumeenia analüüsitud isased karud. Erinevat värvi ringi tähistavad erinevate klastrite esindajaid.

Lisaks Slovakkiale on keskmisest palju madalam Y-kromosoomi mitmekesisus ka Rootsis. Selline tulemus on samuti oodatav, sest ka Rootsi karud on läbinud pudelikaela, mille käigus karupopulatsioon oli kriitiliselt madalas seisus. Tänapäevaks on Rootsi populatsioon taastunud, kuid mitmekesisus on jätkuvalt madal. Ka Soome karude populatsioon oli madalseisus, kuid geneetiline mitmekesisus on arvestatavalt kõrgem kui Rootsis. Põhjuseks on tõenäoliselt see, et Soome populatsioon on idast ühendatud Venemaa populatsiooniga, mille tõttu Soome isakarude geneetiline mitmekesisus on taastunud kiiremini kui Rootsis (Schregel *et al.* 2015).

Eestis on esindatud karud kolmest erinevast klastrist 4, 8 ja 11. Klastrid 4 ja 8 on väga laia levikuga üle kogu Euraasia ning klaster 11 isendid esinevad ainult Euroopas. Y-kromosoomi genotüübiline mitmekesisus on võrreldes Euraasia keskmisega üsna madal (eMLG= 3,98). Selle põhjuseks on ilmselt see, et Eesti pruunkarud on korduvalt läbinud geneetilise pudelikaela kui arvatav arvukus võis olla kõigest 20 isendit (Kaal 1980). Eesti

karude lähiminevik on sarnane Slovakkia karupopulatsiooni omaga, kus samuti oli karude madalaim arvukus vaid paarkümmend isendit. Genotüübilise ühtluse indeks on Eesti karupopulatsioonil väga lähedane ühele ($E.5 = 0,99$), mis tähendab, et kõiki genotüüpe esineb populatsioonis peaaegu võrdselt.

Varasemalt on kirjanduses potentsiaalseks refuugiumialaks pakutud Sajaani-Altai mäestikku (Pavelková Řičánková *et al.* 2014). Seetõttu analüüsiti Altai piirkonna proove eraldi regioonina, et testida antud hüpoteesi. Leiti, et Altais on geneetiline mitmekesisus üks kõrgemaid (eMLG= 9,0) üle kogu Euraasia, kuid siiski madalam kui ida poole jääval alal. Seega Altai ei olnud meie analüüsitud valimi puhul kõige suurema Y-kromosoomi mitmekesisusega ala. Kuid kindlasti me ei lükkaks antud hüpoteesi ümber, kuna meie töös on Altai piirkonnast suhteliselt vähem proove, kui sealt läänepoolse jäävalt alalt, mis on kõrgeima geneetilise mitmekesisusega Euraasias (eMLG= 9,19). Kui edaspidistes uuringutes kaasata veelgi rohkem Altai piirkonnast kogutud proove, siis võivad tulemused erineda meie omadest.

Pruunkaru mtDNA põhjal tehtud töö Korsten ja teiste (2009) poolt toob välja emaskarude paiknemisel selge geograafilise struktuuri. Käesolevas magistritöös Y-kromosoomi tulemustes nii konkreetset geograafilist struktureeritust välja ei tule. Mitmed klastrid on väga laia levikuga üle kogu Euraasia ning mõned klastrid on kitsalt levinud ainult Euroopas. On ka üksikuid klastreid, mis on levinud väiksel geograafilisel alal. Sellised on näiteks klastrid 1 ja 2, mis on levinud ainult Kamtšatka poolsaarel. Selline Y-kromosoomi madalam struktureeritus võrreldes mtDNA-ga oli oodatav tulemus. Ka varasemad tööd on näidanud, et võrreldes Y-kromosoomiga näitab mtDNA oluliselt tugevamat struktureeritust (Bidon *et al.* 2014). Põhjuseks on tõenäoliselt emaste filopatriilisus. Isased liiguvad oma sünnipaigast kaugemale ja läbivad suuremaid vahemaid kui emased ning seetõttu on oodatav, et mtDNA tulemused näitavad selgemat struktuuri kui Y-kromosoomi omad.

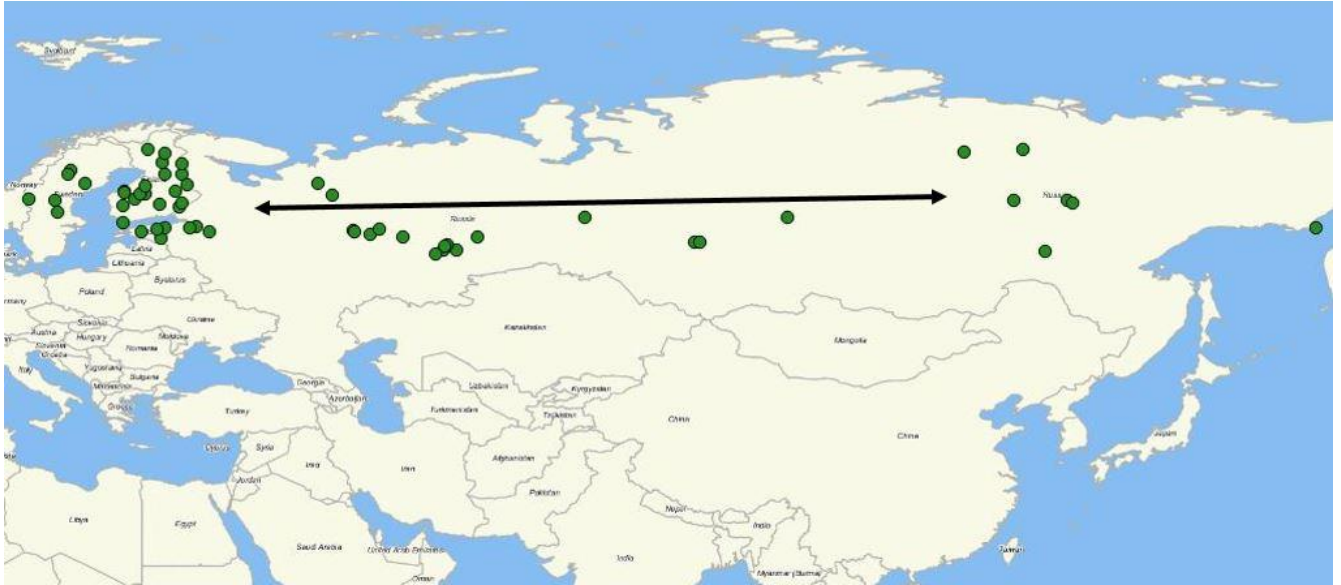
MtDNA põhjal on tuvastatud ida- ja lääneliin (Taberlet & Bouvet 1994), millest viimase mtDNA on sarnasem jääkaru kui pruunkaruga omaga (Cronin *et al.* 1991). Y-kromosoomi mikrosatelliitide põhjal tehtud uuring sellist mustrit aga ei tuvastatud (Bidon *et al.* 2014). Võrreldes antud magistritöö tulemusi Bidoni ja teiste (2014) tulemustega selgub, et ka meie töö tulemused, kus oli kaasatud proove veidi teistsugustelt aladelt,

toetavad varasemat tulemust, et Y-kromosoomi andmete kohaselt jääkaru ei asu fülogeneesipuul pruunkaru mõnedele liinidele lähemal kui teistele.

Antud töös moodustunud 14 erineva klasteri isendite paigutumine viitab sellele, et osade klasterite isendid on olnud refuugiumis Karpaatia mäestikust lõunapool ning osade klasterite isendid Kesk-Venemaal. Keskkonnatingimuste paranedes hakkasid karud leviala suurendama migreerudes mitmetes eri suundades. Kuna suuremaid refuugiumeid on vähemalt kaks, siis meie töö tulemused võimaldavad välja pakkuda mitmeid peale jääaegseid migratsioonistsenaariumeid. Karpaatia mäestiku taga refuugiumis olnud karud liikusid põhja suunas ning asustasid Eesti, Soome ja Venemaa lääneosa (joonis 32). Kesk-Venemaal refuugiumis paiknenud karud liikusid lääne suunas asustades Põhja-Euroopa ning ida suunas rekoloniseerides Kaug-Ida (joonis 33).



Joonis 32. Nooltega on tähistatud klasteri number 11 isendite liikumine refuugiumist Karpaatia mäestiku tagant põhja suunas.



Joonis 33. Noolega on tähistatud klatri number 4 isendite liikumine refuugiumist Kesk-Venemaalt ida ja lääne suunas.

Antud töö valimiks oli 403 pruunkaru proovi üle kogu Euraasia. Kuna Euraasia on väga suur ala, siis on väga keeruline koguda proove nii, et kogu uurimisala oleks väga ühtlaselt kaetud. Proovide kohati ebaühtlane jaotus kindlasti mõjutab analüüside tulemusi. Kuid võrreldes seni tehtud pruunkarude fülogeograafia-alaste töödega on antud magistritöö valim üsna esinduslik ning ala katvus on pigem hea. Edaspidistes uuringutes oleks hea kaasata veelgi rohkem proove Euraasia eri osadest. Kuna Venemaal on võrreldes Euroopaga arvestatavalt rohkem metsaga kaetud ala, ja seetõttu ka karudele sobivamaid elupaiku, siis oleks väga huvitav omada detailsemalt infot Venemaa eri piirkondade isaskarude populatsioonistruktuuri kohta.

Kokkuvõttes näitasid antud töö tulemused, et Y-kromosoomi puhul ei esine nii selget geograafilist struktureeritust kui seda on mtDNA-l; Rootsis ja Slovakkias on madalam geneetiline mitmekesisus, kui ülejäänud Euraasia piirkondades ja Y-kromosoomi geneetiline mitmekesisus on suurim Kaug-Idas; ning peale jääaega liikusid karud Lõuna-Euroopa refuugiumist põhja suunas rekoloniseerides Soome, Eesti ja Lääne-Venemaa ning Kesk-Venemaa refuugiumist ida ja lääne poole rekoloniseerides Põhja-Euroopa ja Kaug-Ida.

6. Kokkuvõte

Töös kasutati geneetiliste markeritena Y-kromosoomi mikrosatelliite, sest tegemist on uniparentaalsete markeritega ning annavad ülevaate isaliini kohta. Uuriti 403 isaslooma üle kogu Euraasia ning analüüside tulemusena jaotusid karud geneetilise sarnasuse alusel 14 eri klastrisse.

Leiti, et Y-kromosoomi puhul ei esine nii selget geograafilist struktureeritust kui seda on mtDNA-l. 14 klastrist osad olid seotud kindla geograafilise piirkonnaga, samas kui teiste levik oli väga lai, kattes suurema osa uurimisalast.

Piirkonniti erines geneetiline varieeruvus üsna suures ulatuses. Alad, kus oli väljapaistvalt madal mitmekesisus, olid hilises minevikus läbinud geneetilise pudelikaela. Sellised piirkonnad olid Slovakkia ja Rootsi, kus arvukus on tänaseks taastunud, kuid geneetiline mitmekesisus on jätkuvalt madal. Genotüübiliselt kõige ühtlasem populatsioon on Eesti. Mõnda genotüüpi oli arvestatavalt rohkem Slovakkia ja Soome populatsioonides, mis omakorda põhjustab geneetilise mitmekesisuse langust.

Antud töös moodustunud 14 erineva klatri isendite paigutumine viitab sellele, et osade klastrite isendid on olnud refuugiumis Karpaatia mäestikust lõunapool ning osade klastrite isendid Kesk-Venemaal. Keskkonnatingimuste paranedes hakkasid karud leviala suurendama migreerudes mitmetes eri suundades. Karpaatia mäestiku taga refuugiumis olnud karud liikusid põhja suunas ning asustasid Eesti, Rootsi, Soome ja Venemaa lääneosa. Kesk-Venemaal refuugiumis paiknenud karud liikusid lääne suunas asustades Põhja-Euroopa ning ida suunas rekoloniseerides Kaug-Ida.

7. Summary

Phylogeography of Brown bear (*Ursus arctos*) patrilineages in Eurasia

Y-chromosome microsatellites were used in this research because they are uniparental markers and give information about paternal lineage. 403 samples were included from all over Eurasia and as a result of analysis the samples divided into 14 clades.

There was not as clear geographical structure in Y-chromosome results as in mtDNA results. Some of the clades were situated in a quite small geographical region, as others were dispersed all over Eurasia.

The genetic variation of Y-chromosome was rather different in regions. Countries that had distinctively low Y-chromosome variation had been through a genetic bottleneck in the near past. Such regions were Slovakia and Sweden where the population has grown but genetic diversity has remained low. Genotypic evenness was highest in Estonia and lowest in Slovakia and Finland. Low genetic evenness also might cause low genetic diversity.

The placement of the 14 clades refers that some of the bears were in a refugium which was situated south from the Carpathians and others in Middle-Russia. After the climate stabilized bears started to expand their territory into different directions. Bears that were in South-European refugium started to expand their territory to north and recolonized Finland, Sweden, Estonia and western part of Russia and bears who were in a refugium in Middle-Russia started to move towards east and west and recolonized North-Europe and Far East.

Tänuavaldused

Eelkõige soovin tänada oma suurepäraseid juhendajaid Peeter Anijalga ja Urmas Saarmat, tänu kelle kannatlikkusele ja põhjalikele nõuannetele see töö valmis. Lisaks neile soovin tänada koostööpartnereid üle kogu Euraasia, kelle saadetud proovide põhjal sai töö koostatud. Suur tänu kõigile!

Kasutatud kirjandus

- Árnason, Ú., 2016. The Out of Africa hypothesis and the ancestry of recent humans: *Cherchez la femme (et l'homme)*. *Gene*, 585(1), pp.9–12.
- Avise, J.C., 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*, Cambridge (MA): Harvard University Press.
- Berlin, S. & Ellegren, H., 2004. Chicken W: a genetically uniform chromosome in a highly variable genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(45), pp.15967–15969.
- Bidon, T. *et al.*, 2014. Brown and polar bear y chromosomes reveal extensive male-biased gene flow within brother lineages. *Molecular Biology and Evolution*, 31(6), pp.1353–1363.
- Clark, P.U. *et al.*, 2009. The Last Glacial Maximum. *Science*, 325(5941), pp.710–714.
- Cronin, M.A. *et al.*, 1991. Interspecific and intraspecific mitochondrial DNA variation in North American bears (*Ursus*). *Canadian Journal of Zoology*, 69(12), pp.2985–2992.
- Davison, J. *et al.*, 2011. Late-Quaternary biogeographic scenarios for the brown bear (*Ursus arctos*), a wild mammal model species. *Quaternary Science Reviews*, 30(3–4), pp.418–430.
- Edwards, C.J. *et al.*, 2011. Ancient hybridization and an irish origin for the modern polar bear matriline. *Current Biology*, 21(15), pp.1251–1258.
- Goldstein, D.B. & Schlötterer, C., 1999. *Mikrosatellites: Evolution and Application*, Oxford University Press.
- Greenwood, P.J., 1980. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behaviour*.
- Greminger, M.P. *et al.*, 2010. The quest for Y-chromosomal markers - methodological strategies for mammalian non-model organisms. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), pp.409–420.
- Hallast, P. & Jobling, M.A., 2017. The Y chromosomes of the great apes. *Human Genetics*, 136(5), pp.511–528.

- Hellborg, L. & Ellegren, H., 2004. Low Levels of Nucleotide Diversity in Mammalian Y Chromosomes. *Molecular Biology and Evolution*, 21(1), pp.158–163.
- Hewitt, G., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), pp.907–913.
- Hughes, J.F. *et al.*, 2010. Chimpanzee and human Y chromosomes are remarkably divergent in structure and gene content. *Nature*, 463(7280), pp.536–539.
- Hughes, J.F. *et al.*, 2012. Strict evolutionary conservation followed rapid gene loss on human and rhesus Y chromosomes. *Nature*, 483(7387), pp.82–86.
- Hurles, M.E. & Jobling, M. a., 2001. Haploid chromosomes in molecular ecology: Lessons from the human Y. *Molecular Ecology*, 10(7), pp.1599–1613.
- Hurst, L.D. & Ellegren, H., 1998. Sex biases in the mutation rate. *Trends in Genetics*, 14(11), pp.446–452.
- Iacolina, L. *et al.*, 2016. Novel Y-chromosome short tandem repeats in *Sus scrofa* and their variation in European wild boar and domestic pig populations. *Animal Genetics*, 47(6), pp.682–690
- Jobling, M. a & Tyler-Smith, C., 2003. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nature Reviews. Genetics*, 4(8), pp.598–612.
- Jurka, J., 2000. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research*, 10(7), pp.967–981.
- Kaal, M., 1980. Pruunkaru, Tallinn: Valgus.
- Kamvar, Z.N., Tabima, J.F. & Grünwald, N.J., 2014. Poppr : an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2, pp.e281.
- Keis, M. *et al.*, 2013. Complete mitochondrial genomes and a novel spatial genetic method reveal cryptic phylogeographical structure and migration patterns among brown bears in north-western Eurasia. *Journal of Biogeography*, 40(5), pp.915–927.
- Kitchen, A., Miyamoto, M.M. & Mulligan, C.J., 2008. A Three-Stage Colonization Model for the Peopling of the Americas. *PLoS ONE*, 3(2), pp.e1596.

- Kobl Müller, S. *et al.*, 2016. Whole mitochondrial genomes illuminate ancient intercontinental dispersals of grey wolves (*Canis lupus*). *Journal of Biogeography*, 43(9), pp.1728–1738.
- Korsten, M. *et al.*, 2009. Sudden expansion of a single brown bear maternal lineage across northern continental Eurasia after the last ice age: A general demographic model for mammals? *Molecular Ecology*, 18(9), pp.1963–1979.
- Kundu, S. & Ghosh, S.K., 2015. Trend of different molecular markers in the last decades for studying human migrations. *Gene*, 556(2), pp.81–90.
- MacDonald, A.J., 2008. Sex chromosome microsatellite markers from an Australian marsupial: development, application and evolution.
- Meadows, J.R.S., Hawken, R.J. & Kijas, J.W., 2004. Nucleotide diversity on the ovine Y chromosome. *Animal Genetics*, 35(5), pp.379–85.
- Meiri, M. *et al.*, 2013. Faunal record identifies Bering isthmus conditions as constraint to end-Pleistocene migration to the New World. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1776), p.20132167.
- Montell, H., Fridolfsson, A.K. & Ellegren, H., 2001. Contrasting levels of nucleotide diversity on the avian Z and W sex chromosomes. *Molecular Biology and Evolution*, 18(11), pp.2010–2016.
- Morin, P.A. *et al.*, 2009. Normalization and binning of historical and multi-source microsatellite data: Overcoming the problems of allele size shift with allelogram. *Molecular Ecology Resources*, 9(6), pp.1451–1455.
- Pavelková Řičánková, V., Robovský, J. & Riegert, J., 2014. Ecological structure of recent and last glacial mammalian faunas in northern Eurasia: the case of Altai-Sayan refugium. *PloS one*, 9(1), pp.e85056.
- Pérez, T. *et al.*, 2011. Y-chromosome phylogeny in the evolutionary net of chamois (genus *Rupicapra*). *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), p.272.
- R Core Team, 2013. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Rohling, E.J. *et al.*, 1998. Magnitudes of sea-level lowstands of the past 500,000 years. *Nature*, 394(July), pp.162–165.

- Saarma, U. *et al.*, 2007. Mitogenetic structure of brown bears (*Ursus arctos* L.) in northeastern Europe and a new time frame for the formation of European brown bear lineages. *Molecular Ecology*, 16(2), pp.401–413.
- Schregel, J. *et al.*, 2015. Y chromosome haplotype distribution of brown bears (*Ursus arctos*) in Northern Europe provides insight into population history and recovery. *Molecular Ecology*, 24(24), pp.6041–6060.
- Skaletsky, H. *et al.*, 2003. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*, 423(6942), pp.825–837.
- Soh, Y.Q.S. *et al.*, 2014. Sequencing the mouse y chromosome reveals convergent gene acquisition and amplification on both sex chromosomes. *Cell*, 159(4), pp.800–813.
- Sommer, R.S. & Benecke, N., 2005. The recolonization of Europe by brown bears *Ursus arctos* Linnaeus, 1758 after the Last Glacial Maximum. *Mammal Society, Mammal Review*, 35(2), pp.156–164.
- Statham, M.J. *et al.*, 2014. Range-wide multilocus phylogeography of the red fox reveals ancient continental divergence, minimal genomic exchange and distinct demographic histories. *Molecular Ecology*, 23(19), pp.4813–30.
- Stewart, J.R. *et al.*, 2010. Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 277(1682), pp.661–71.
- Straka, M. *et al.*, 2012. Microsatellite diversity and structure of Carpathian brown bears (*Ursus arctos*): Consequences of human caused fragmentation. *Conservation Genetics*, 13(1), pp.153–164.
- Štofík, J. *et al.*, 2013. Time and spatial trends in the brown bear *Ursus arctos* population in Slovakia (1900–2010). *Folia Oecologica*, 40(1), pp.117–129.
- Zedrosser, A. *et al.*, 2007. Should I stay or should I go? Natal dispersal in the brown bear. *Animal Behaviour*, 74(3), pp.369–376.
- Zink, R.M. & Barrowclough, G.F., 2008. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology*, 17(9), pp.2107–21.
- Taberlet, P. & Bouvet, J., 1994. Mitochondrial DNA Polymorphism, Phylogeography, and

Conservation Genetics of the Brown Bear *Ursus arctos* in Europe. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 255(1344), pp.195–200.

Tammeleht, E. *et al.*, 2010. Genetic structure in large, continuous mammal populations: The example of brown bears in northwestern Eurasia. *Molecular Ecology*, 19(24), pp.5359–5370.

Waits, L. *et al.*, 2000. Nuclear DNA microsatellite analysis of genetic diversity and gene flow in the Scandinavian brown bear (*Ursus arctos*). *Molecular ecology*, 9(4), pp.421–431.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Sandra Poks,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Pruunkaru (*Ursus arctos*) isaliinide fülogeograafia Euraasias“, mille juhendajad on Peeter Anijalg ja Urmas Saarma.

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace´i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **24.05.2017**