

## **DNA-põhise metoodika välja töötamine ja tõhususe hindamine haugi efektiivse kudekarja suuruse seiramiseks Saaremaa rannikumeres**

(Deliverable 2.7.1. Development and evaluation of the performance of the proposed DNA-based procedure for estimation of effective number of pike breeders in the pilot spawning areas at coastal sea of Saaremaa)

Teostatud projekti "Eesti mereala keskkonna ja loodusväärtuste hindamise ja seire innovaatilised lahendused" raames

Version 1, 11.06.2021

Leping: RITA1/02-60-05

Kogu projekti vastutav täitja: Georg Martin

Alateema vastutav täitja: Anti Vasemägi

Aruande koostajad: Anti Vasemägi, Alfonso Diaz Suarez, Riho Gross, Veljo Kisand, Kristel Panksep, Kerli Haugjärv, Mehis Rohtla, Roland Svirgsden, Markus Vetemaa



## Sisukord

Excutive summary **4**

1. Sissejuhatus **5**

2. Materjal ja metoodika **7**

2.1. Uuringualad **7**

2.2. Mikrosatelliidimarkerite paneeli välja töötamine ja genotüpiseerimine **8**

2.3. Efektiivse kudekarja suuruse ja efektiivse populatsiooni suuruse hindamise meetodid **9**

2.4. Populatsioonigeneetiline analüüs **10**

3. Tulemused **11**

3.1. Täis- ja poolõvede detekteerimine **11**

3.2. Efektiivse kudekarja suuruse hinnangud **13**

3.3. Kudealade ja aastaklasside geneetiline muutlikkus ja diferentseerumine **14**

4.1. Arutelu ja kokkuvõte **17**

4.2. Soovitused efektiivse kudekarja suuruse hindamiseks **18**

5. Kasutatud kirjandus **19**

## Executive Summary

**This study was financially supported by the European Regional Development Fund within National Programme for Addressing Socio Economic Challenges through R&D (RITA).**

## 1. Sissejuhatus

Paljude kalaliikide arvukuse vähenemine näitab kiiret vajadust rakendada informatiivsemaid seireprogramme ning parandada käimasolevate majandamis- ja kaitsemeetmete tõhusust (Rice & Legace 2007). Alates 1960-ndatest aastatest on magevees ja vooluveekogudes elavate kalaliikide seire kõige laialdasemalt kasutatavateks vahenditeks nakkevõrgud ja standardiseeritud elektripüük. Kuigi eelpooltoodud meetodid on üldjuhul asurkondade arvukuse hindamisel informatiivsed, on nii nakkevõrkude ja elektripüügi kasutamine aeganõudev, kallis ja sageli invasiivne. Samuti ei ole võimalik noorjärkude ja suguküpsete isendite arvukuse andmete põhjal hinnata üht kõige olulisemat populatsiooni parameetrit, kudekarja efektiivset suurust ehk edukalt paljunenud sugukalade arvu ( $N_{eb}$ ).

Viimasel ajal on geneetilise muutlikkuse ja mitmekesisuse seireprogrammide vajalikkust hakatud üha laiemalt teadvustama ning geneetilist seiret nähakse kui väärtuslikku vahendit ohustatud populatsioonide geneetiliste muutuste hindamisel (Schwartz jt. 2007). Populatsiooni efektiivse suuruse ( $N_e$ ) hindamine on selles kontekstis eriti oluline, sest  $N_e$ , mitte lihtsalt populatsiooni isendite arvukus, määrab juhusliku geneetilise triivi ja inbriidingu kaudu populatsiooni geneetilise varieeruvuse taseme (populatsiooni efektiivne suurus,  $N_e$ , on ideaalpopulatsiooni suurus, mis käitub juhusliku geneetilise triivi tingimustes sarnaselt uuritava populatsiooniga). Samas on geneetiliste meetodite kasutamine majandatavate loomaliikide seires (Laikre jt. 2010) ning ajaliste geneetiliste lähenemisviiside kaasamine kalavarude majandamise ja säilitamise kavadesse olnud üsna aeglane (Hare jt. 2011). Ajaliste lähenemisviiside piirangute ületamiseks on välja töötatud mitu DNA-põhist meetodit, mis põhinevad ühel ajahetkel kogutud proovide analüüsil. Need meetodid hindavad efektiivse populatsiooni suurust tuginedes uuritud geneetiliste markerite aheldustasakaalutusele (ingl. k. *linkage disequilibrium*), heterosügootide ülekaalule või lähisuguluses olevate indiviidide sagedusele valimis (ingl. k. *sibship assignment*, SA).

Ühel ajahetkel kogutud geneetiliste proovide analüüsil peetakse just viimast, st. lähisuguluses olevate indiviidide sageduse hindamise meetodikat üheks informatiivseimaks ohustatud populatsioonide arvukuse hindamisel (Jones & Wang 2010). Samal aastal marjast koorunud kaladele (aastaklass ehk kohort) rakendatuna pakuvad SA meetodid võimalust hinnata efektiivset kudejate arvu ( $N_{eb}$ ) ja potentsiaalselt ka tegelikku kudejate arvu ( $N_b$ ). SA meetod põhineb pool- ja täisõvede (õdede-vendade) esinemissageduse hindamisel populatsioonis ja on rakendatav ka isendite sisserände ehk immigratsiooni esinemise korral (Wang 2009). Lisaks võtab SA meetod arvesse mitte-juhuslikku paaritumise võimalust ning genotüpiseerimise vea esinemise võimalust (Wang 2009). Seda saab rakendada nii kattuvate kui mittekattuvate põlvkondadega populatsioonide puhul, andes  $N_{eb}$  hinnangu juhul kui üksikisendite juhuslik valim kogutakse ühest kohordist. SA meetodika annab ideaaltingimustes teavet ka eri soost vanemate arvu kohta (st. isas- ja emassugukalade suhe paljunemisel). Selline info on oluline nii ohustatud populatsioonide kaitsmise kui majandatavate liikide puhul, sest efektiivse populatsiooni suuruse vähenemine võib olla tingitud paljunemisel osalevate isas-ja emassugukalade erinevast arvust, sugukalade väiksest arvust või perekondade suuruse varieerumisest (Wang 2009).

Viimasel ajal on SA meetodika abil uuritud noorjärkude sugulust, paaritumissüsteeme ja mitmete tunnuste päritavust looduslikes populatsioonides (n. Debes jt 2018). Mõni aeg tagasi rakendas meie uurimisgrupp SA meetodikat jõforellil, et hinnata forelli kudepaikade taastamise mõju ja efektiivsust Eesti jõgedes ja ojades (Ozerov jt 2015). Avaldatud töös avastasime, et juhul kui jões esineb tugev forellipopulatsioon, siis võetakse taastatud kudealad kiiresti kasutusele, samal ajal aga jõgedes, kus forelli sugukalasad napib, on ka taastatud kudealade kasutuselevõtt aeglasem ning positiivne mõju väiksem. Samas pole merekeskonnas siiani SA meetodikat laialdasemalt kasutatud, et hinnata kudekarja arvukust ja elupaikade kvaliteeti. Lisaks pole SA meetodikat meile teadaolevalt veel lülitatud ohustatud kalaliikide geneetilistesse seireprogrammidesse.

### Haugi kudekarjade suuruse hindamine Saaremaa lõuna- ja lääneosas

Läänemeri on madala soolsusega sisemeri, mistõttu on selle kalastikus esindatud ka paljud mageveeliigid. Tüüpilistest mageveekaladest on Läänemere rannikualadel iseloomulikum ahven, haug, koha, luts, vimb, särg ja säinas. Kuigi osad neist vajavad kudemiseks eranditult magevett (luts, vimb), siis teised on võimelised kudema suuremal või vähemal määral ka riimvees (Ojaveer jt. 2003, Rohtla jt. 2012, Rohtla 2015). Haug on üks väheseid röövkalu Läänemere rannikualadel ja on seetõttu ökoloogiliselt äärmiselt oluline liik. Haug on tüüpiline mageveekala, kes Läänemeres koeb nii riimvees kui ka merega ühenduses olevates rannikuäärsetes mageveekogudes. Osadel merealadel on riimvees ja magevees kudevate haugide vahetõrje vahel võrdne (Engstedt jt. 2010), teistes jällegi domineerivad kas riimvees (Möller jt. 2019) või magevees kudevad haugid (Rohtla 2015). Eesti rannikumeres domineerivad käeasoleval ajal magevees kudevad haugid (Rohtla 2015), kuid mõned aastakümned tagasi oli meres kudeva haugi osakaal tõenäoliselt palju suurem (Erm jt. 1970). Tõenäoliselt sõltub riimvees ja magevees kudevate haugide vahetõrje vahel konkreetsetel merealadel järgnevatest tingimustest: 1) kas piirkonnas on kudemiseks ja noorjärkude kasvualaks sobivaid mageveekogusid ja kas need on ka haugidele ligipääsetavad, 2) kas merekudealadel valitsevad abiootilised ja biootilised tegurid võimaldavad edukat sigimist. Arvatakse, et Läänemere eutrofeerumine on vallandanud nõrkade efekti, mille tulemusel on halvenenud merekudealade kvaliteet ning suurenenud ogaliklaste kisklus haugi marjateradele ja vastsetele (Nilsson 2006, Eriksson jt. 2009). Seega on haugi staatus Eestis 1960-70-ndatega võrreldes üldiselt kehv. Kõige arvukam on haugivaru Väinamere piirkonnas, kus enamik kalu pärineb Matsalu ja Haapsalu lahtede märgaladest ning ojadest (Rohtla 2015). Samas Saaremaa lääne- ja lõunaosas asuvad haugivarud on üsna kehvast seisukorras, tõenäoliselt seetõttu, et puuduvad sobivad mageveekudemispaigad (nt suuremad märgaladega jõed) ja halvenenud on riimvee kudemispaikade kvaliteet. Mitmed hiljutised populatsioonigeneetilised uuringud Läänemere haugil on leidnud varasemate märgistamisega kooskõlas peene geneetilise alamstruktureerituse ja väikse efektiivse populatsiooni suuruse (Berggren jt. 2016, Wenneström jt. 2017). Saaremaa rannikuvetes paljuneva haugi kudekarjade suurus, nende geneetiline muutlikkus, diferentseerumise tase ja geneetilise struktuur on aga siiani uurimata.

## Töö eesmärk ja uurimisrühm

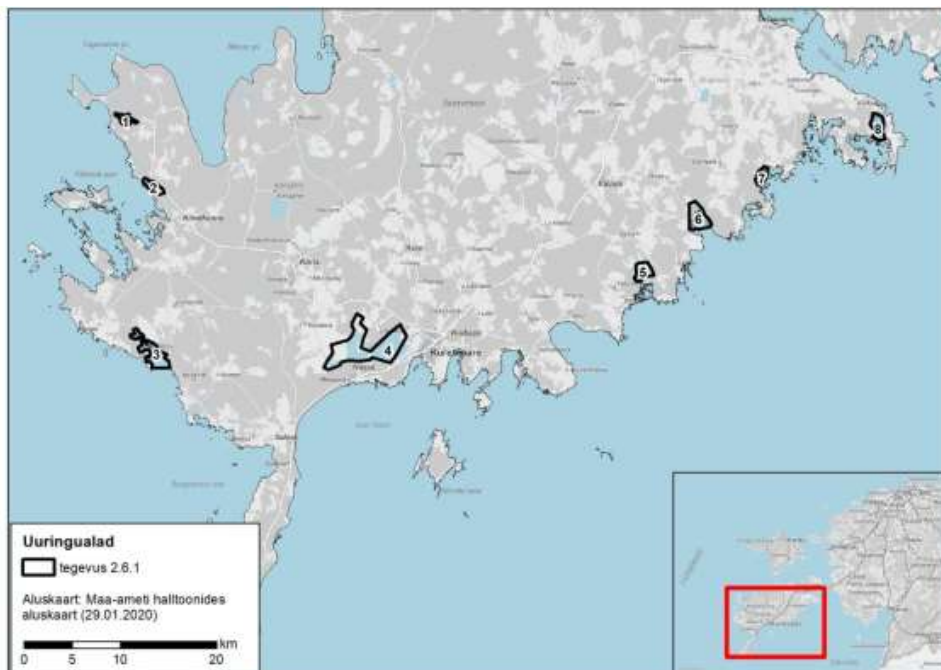
Käesoleva töö eesmärgiks oli välja töötada DNA-põhise seire metoodika haugil ning hinnata selle tõhusust Saaremaa rannikumere kudealadel keskendudes peamiselt efektiivse kudekarja suuruse hindamise metoodikale. Töö teostasid Eesti Maaülikooli Vesiviljeluse õppetooli töötajad Anti Vasemägi, Alfonso Diaz Suarez, Riho Gross, Veljo Kisand ja Kristel Panksep koostöös Tartu Ülikooli Eesti Mereinstituudi töötajatega (Mehis Rohtla, Roland Svirgsden, Lagle Matetski, Kristiina Jürgens, Mari-Liis Põlme, Jürgen Karvak ja Markus Vetemaa).

Uuringu tellis ja uuringut rahastab Eesti Teadusagentuur Euroopa Regionaalarengu Fondist toetatava programmi „Valdkondliku teadus- ja arendustegevuse tugevdamine“ (RITA) tegevuse 1 „Strateegilise TA tegevuse toetamine“ kaudu. Uuring valmis Keskkonnaministeriumi eesmärkide elluviimiseks.

## 2. Materjal ja metoodika

### 2.1. Uuringualad

Uuringud teostati kaheksal alal Saaremaa lõuna- ja lääneosas, mille numeratsioon ja nimetused on välja toodud Joonisel 1 ja Tabelis 1.



Joonis 1. Uuringualade paiknemine Saaremaal.

**Tabel 1.** Edukalt genotüpiseeritud haugide arv uuritud Saaremaa kude- ja turgutusaladel aastatel 2019-2020.

Järjekorra number	Uuritud ala nimetus	Samasuvised Vanemad		
		2019	2020	2019-2020
1	Killatu järv	0	39	11
2	Pautsaare laht ja Lehmalahk	45	44	73
3	Pilguse laht	0	0	0
4	Mullutu-Suurlahk	24	24	56
5	Oessaare laht	33	41	25
6	Kõiguste laht (k.a. Maadevahe jõe suudmeala)	6	17	19
7	Saastna laht (Kuke peakraavi suue)	0	0	28
8	Arju laht	0	0	0

Konkreetsed uuringualad valiti välja selle järgi, et need hõlmaksid erineva hüdroloogilise režiimi ja suurusega mageveekaladele potentsiaalselt sobivaid haugi kude- ja turgutusalasid. Kahe aasta jooksul koguti koeproovid geneetiliseks anaüüsiks kokku 274 samasuviselt ja 218 vanemalt haugilt seitsmelt kudealalt. Pilguse lahest ja Arjulahest haugi ei tabatud. Saastna lahe alalt koguti proovid Kuke peakraavi suudme ümbrusest. Koeproovid koguti võimalikult suurelt alalt, et valim peegeldaks võimalikult tõeselt kogu uuritud ala. Koeproovid koguti kolme kuu jooksul, maist juulini, kasutades elektripüügiagregaati või maimunoota. Samasuvised haugid transporditi külmutatult edaspidiseks analüüsiks Tartu Ülikooli Eesti Mereinstituudi laborisse, kus koguti lihaskoe proovid, mis säilitati 95% etanoolis. Molekulaarsed analüüsid viidi läbi Eesti Maaülikooli vesiviljeluse õppetooli geneetikalaboris.

## 2.2. Mikrosatelliitmarkerite paneeli välja töötamine ja genotüpiseerimine

Nii genoomne kui mitokondriaalne DNA eraldati ränipartiklidel põhineva DNA isoleerimismeetodi abil (DNeasy®, Qiagen). Kokku testiti üksteist mikrosatelliitmarkeri lookust, millest üheksa oli võimalik amplifitseerida ühes multiplexsses polümeraasi ahelreaktsioonis (ingl. k. *multiplex PCR reaction*). Kõik lookused märgistati fluorestseeruvate märgistega (NED, FAM, HEX; PET). Esialgse analüüsi tulemusena jäeti edasisest analüüsist välja üks mikrosatelliidilookus, mille amplifikatsioon oli nõrk ning selle allelipikkused kattusid osaliselt teise lookuse allelipikkustega. Kokku genotüpiseeriti kogutud proovid 10 mikrosatelliitmarkeriga: Elu19, Elu51, Elu64, Elu76, Elu87 (Miller ja Kapuscinski); EluBeINRA, EluBe38INRA (Launey jt. 2003); Elu10, Elu12 (Hansen, Taggart ja Meldrup, 1999); ja EmaD4 (Sloss, Franckowiak ja Murphy, 2008). Polümeraasi ahelreaktsioonid viidi läbi kasutades SBS HOT FIREPOL Multiplex Mix® (Solis Biodyne) kitti, primereid lõppkontsentratsiooniga 200 nM ja 10-20 ng haugi DNA-d. Amplifikatsiooni tsükli esmane aktiveerimine kestis 12 minutit temperatuuril 95 °C, millele järgnes 28 tsükli: denaturatsioon 20 sekundit temperatuuril 95 °C, lõõmutamine 60 sekundit temperatuuril 58 °C, amplifikatsioon 60 sekundit temperatuuril 72 °C. Viimane amplifikatsioon kestis 10 minutit temperatuuril 72 °C. Amplifikatsiooni produktid genotüpiseeriti geneetilise analüsaatori ABI 3500xl



(Applied Biosystems) abil ja genotüübid määrati kasutades GeneMapper tarkvara v5.0 (Applied Biosystems). Mikrosatelliitide genotüpiseerimine viidi edukalt läbi 485 haugil 492-st (Tabel 1). Seitsme indiviidi puhul ebaõnnestus amplifitseerumine vaatamata mitmetele katsetele tõenäoliselt DNA madala kvaliteedi tõttu.

### 2.3. Efektiivse kudekarja suuruse ja efektiivse populatsiooni suuruse hindamise meetodid

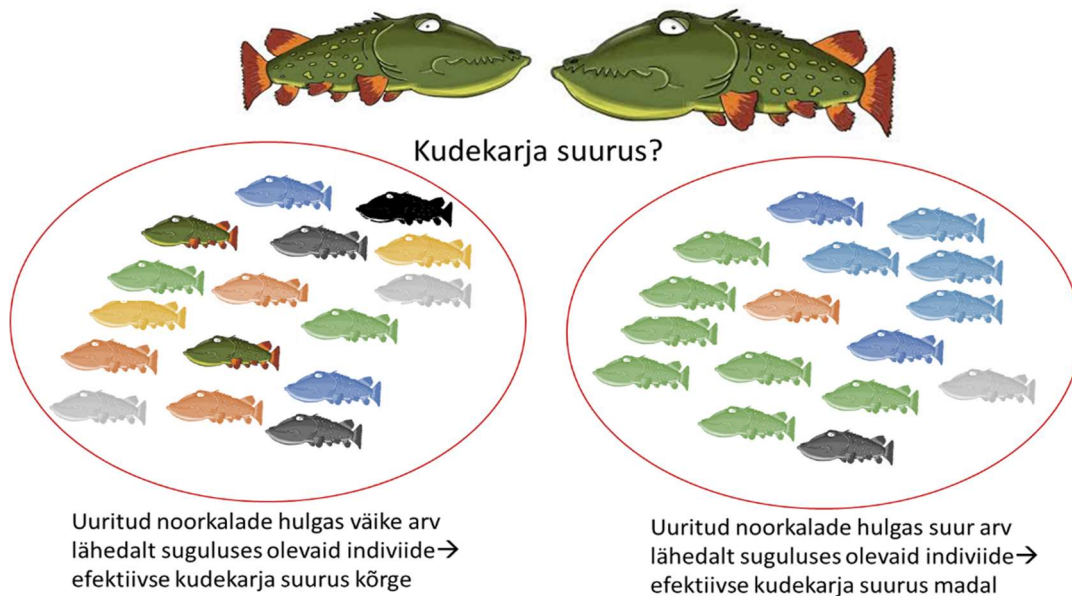
Igalt kude- ja turgutusalalt kogutud proovid jagati kolme rühma: 2019. aastal püütud samasuvised haugid, 2020. aastal püütud samasuvised haugid ja vanemad kalad. Kokku hindasime efektiivse kudekarja suurust kasutades sugulussidemete analüüsi kaheksas valimis kasutades tarkvara COLONY v2.0.6.5 (Jones ja Wang 2010)

Sugulussidemete meetod (Wang 2009) põhineb tõenäosusel, et kaks juhuslikult valitud indiviidi populatsioonist on lähisugulased (täis- või poolõved). Kui efektiivse populatsiooni suurus,  $N_e$  on väike, on suur tõenäosus, et kaks indiviidil on omavahel lähedalt suguluses. Kui  $N_e$  on suur, on tõenäosus, et kaks järglast on omavahel lähedalt suguluses väga madal (Joonis 2). Wang (2009) tuletas võrrandi  $N_e$  arvutamiseks diploidses populatsioonis funktsioonina täis- ja poolõvede sagedusest, kus  $N_1$  ja  $N_2$  on isaste ja emaste sugukalade arv igas diskreetses põlvkonnas,  $Q_1$ ,  $Q_2$  ja  $Q_3$  on vastavalt isapoolsed poolõved, emapoolsed poolõved ja täisõved ning  $\alpha$  on Hardy – Weinbergi tasakaalust kõrvalekallet peegeldav statistik (võrdne Wrighti (1969) inbriidingukoefitsiendiga  $F_{IS}$ ). (Võrrand 1).

$$\frac{1}{N_e} = \frac{1+3\alpha}{4}(Q_1+Q_2+2Q_3) - \frac{\alpha}{2} \left( \frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \right)$$

Seega saab Wang (2009) poolt välja töötatud sugulussidemete meetodikat kasutades hinnata efektiivse populatsiooni suurust,  $N_e$ , juhul kui kogutud proovide vanuseline struktuur sarnaneb populatsiooni tõelise vanuselise struktuuriga. Juhul kui sugulussidemete analüüs viiakse läbi kasutades ainult ühte vanuseklassi (kohorti), võib sugulussidemete analüüsi abil hinnata efektiivse kudekarja suurust,  $N_{eb}$  selles aastaklassis. Käesolevas töös keskendusime just viimase parameetri,  $N_{eb}$  hindamisele. Kasutades tarkvara COLONY v2.0.6.5 (Jones ja Wang 2010) analüüsiti valimid, kus oli vähemalt 20 indiviidi, eeldades, et paarumine võib olla polügaamne. Ülejäänud parameetrid (permutatsioonide kestvus, analüüsi täpsus) valiti vaikimisi. Varasemad uuringud on näidanud, et efektiivse kudekarja suuruse,  $N_{eb}$  hinnang on usaldusväärne juhul kui uuritud noorjarkude arv on sarnane või suurem kui  $N_{eb}$  (Ackerman jt. 2017). Juhul kui analüüsitud noorjarkude arv on väiksem kui populatsiooni tegelik efektiivse kudekarja suurus, on hinnatud  $N_{eb}$  väiksem kui tegelik  $N_{eb}$ . Seega on sugulussidemete meetodika efektiivse kasutamise üheks oluliseks eelduseks piisava noorkalade proovide arvu olemasolu võrreldes tegeliku efektiivse kudekarja suurusega. Paraku pole võimalik enne analüüsi läbiviimist tavaliselt usaldusväärselt hinnata  $N_{eb}$  suurust. Seetõttu hindasime alternatiivse parameetrina täisõvede sagedust kogu uuritud proovis kuna täisõvede sageduse hinnang ei ole otseselt seotud  $n/N_{eb}$  suhtega kuid siiski

peegeldab kaudselt kudekarja suurust. Juhul kui kudekarja suurus on väike, on täisõvede sagedus uuritud proovis kõrge. Samas, suure kudekarja puhul on täisõvede sagedus uuritud proovis madal (Joonis 2). Lisaks sugulussidemete meetodile hindasime efektiivse populatsiooni suurust, ( $LD_{Ne}$ ), põhinedes markerite ahelduse analüüsile kasutades LDNe programmi (Waples & Do 2008).



**Joonis 2.** Kudekarja suuruse hindamise põhiprintsiip lähisugulaste sageduse põhjal.

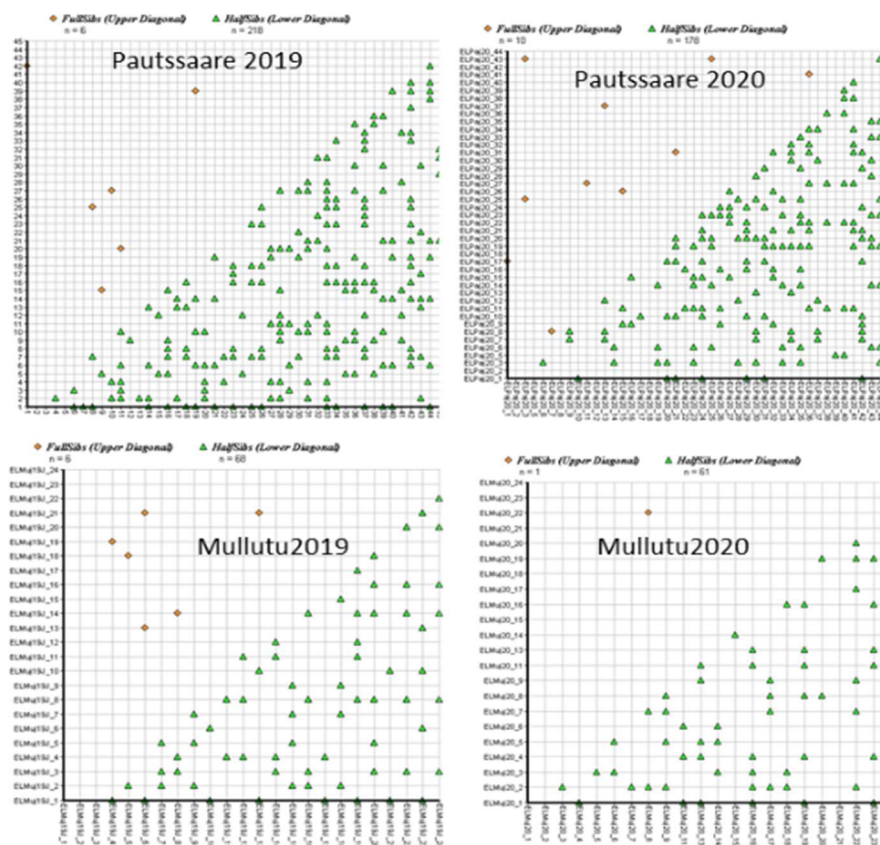
## 2.4. Populatsioonigeneetiline analüüs

Lisaks sugulussidemete analüüsile viisime läbi terve rea populatsioonigeneetilisi analüüse, et hinnata kudealade ja aastaklasside geneetilist muutlikkust ja nendevahelist geneetilist diferentseerumist, kuna Eesti rannikumere haugi asurkondade kohta puuduvad siiani vastavad teadmised. Lisaks annavad populatsioonigeneetilised uuringud täiendavat teavet populatsioonide suuruse kohta, mis on käesoleva uuringu põhifookus. Hardy-Weinbergi (H-W) tasakaalust kõrvalekallet testiti kasutades Genepop tarkvara paketti R v4.0.3 keskkonnas. Alleelide koguarv, keskmine alleelide arv lookuse kohta, tegelik heterosügootsus ( $H_o$ ) ja eeldatav heterosügootsus ( $H_e$ ) arvutati Arlequin v3.5 abil (Excoffier ja Heckel, 2006). Valimi suurusele korrigeeritud keskmine alleelide arv ehk alleelirohkus (minimaalse valimi puhul 6 diploidset indiviidi) ja inbriidingukoefitsent ( $F_{IS}$ ) leiti kasutades FSTAT 2.94 tarkvara (Goudet 2003). Privaatsete alleelide arv valimi kohta arvutati GENALEX v6.5 abil. Arlequin v3.5 abil arvutati diferentseerumisindeksi ( $F_{ST}$ ) paarikaupa väärtused ja populatsioonide vahelisi erinevusi testiti kasutades 9999 permutatsiooni (Excoffier ja Heckel, 2006). Lisaks viidi läbi peakomponentide analüüs (PCA) ja peakomponentide diskriminantanalüüs (DAPC), et graafiliselt visualiseerida geneetilised erinevused aastaklasside, populatsioonide ja indiviidide vahel. Minimaalne säilitatud peakomponentide arv oli PCA puhul kümme ning DAPC puhul viis eristavat funktsiooni. Analüüs viidi läbi Adegeneet v2.1.3 paketi abil kasutades Rstudio v4.0.3 tarkvara.

### 3. Tulemused

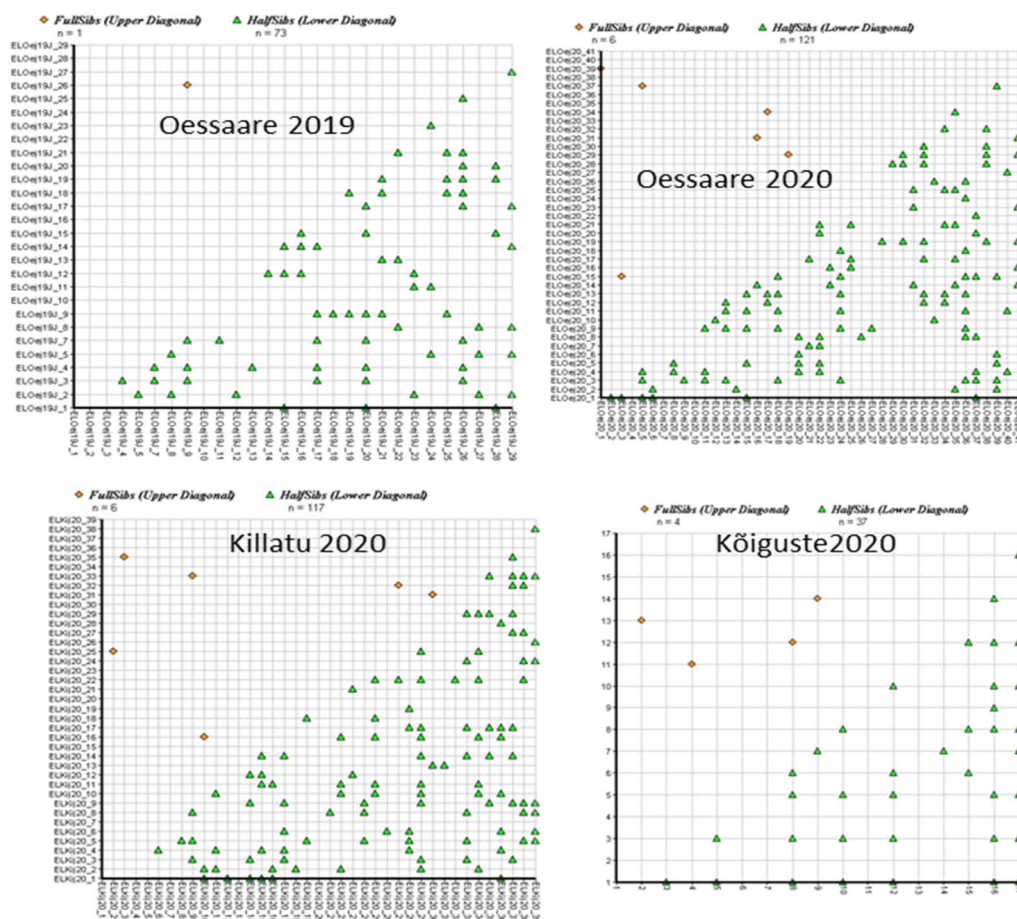
#### 3.1. Täis- ja poolõvede detekteerimine

Kokku oli võimalik hinnata samasuviste haugide sugulussidemete põhjal efektiivse kudekarja suurust viiel kudealal ning kolmel juhul nii 2019 kui 2020. aastal kogutud materjalist. Sugulussidemete analüüsil, kasutades tarkvara COLONY, avastati igas uuritud proovis 2-17 täisõve (kesmine 9,25) ning veelgi rohkem poolõvesid (joonis 3, 4). Samas kordusanalüüside tulemusel oli poolõvede identifitseerimise täpsus madal, mis sarnaselt avaldatud töödele viitab sellele, et poolõvede täpseks identifitseerimiseks on vaja kasutada suuremat arvu markerlookuseid või väga kõrge muutlikkusega mikrosateliidilookusi (Ackerman jt. 2017). Seetõttu põhineb alljärgneval analüüsil peamiselt täisõvede identifitseerimisel. Samas poolõvede detekteerimise ebatäpsus varasemate uuringute alusel ei oma suurt mõju efektiivse kudekarja suuruse hinnangutele (Ackerman jt. 2017).



**Joonis 3.** Täisõvede ja poolõvede esinemine Pautsaare ja Mullutu-Suurlahe kudealadel 2019-2020 aastal. Nii x kui y teljel on järjestatud uuritud haugi noorjärgud valimis. Oranžid rombid tähistavad täisõve paari esinemist, roheline kolmnurk tähistab võimaliku poolõve paari esinemist.

Kõige vähem esines täisõvesid Oessaare 2019 ja Mullutu-Suurlaht 2020. aastal kogutud proovides (üks paar täisõvesid, joonis 3, 4). Kõige rohkem leiti täisõvesid Pautsaare 2020. aastal kogutud valimis (17 täisõve kaheksast eri perekonnast). Täisõvede sagedus uuritud proovides varieerus 6-47% vahel (keskmine 23%). Kõige väiksem oli täisõvede sagedus Oessaare 2019. aastal kogutud valimis (7%) ning Mullutu-Suurlaht 2020. aastal kogutud valimis (9%). Täisõvede sagedus oli kõrgeim Kõiguste 2020 (47%), Pautsaare 2020 (40%) ja Mullutu-Suurlaht 2019 (38%) valimis. Kokkuvõtlikult võib öelda, et täisõvede sagedus uuritud valimis peegeldab tõenäoliselt hästi efektiivse kudekarja suurust. Selle statistiku alusel oli efektiivse kudekarja suurus väiksem Kõiguste kudealal 2020 aastal ning suurim Oessaare 2019 ja Mullutu-Suurlaht 2020 kudealadel. Mõnevõrra üllatav oli täisõvede sageduse aastatevaheline varieeruvus. Näiteks oli Mullutu Suurlahe täisõvede sagedus aastal 2019 märkimisväärselt kõrgem (38%) kui 2020 aasta proovides (9%). Samas näiteks Oessaares oli täisõvede sagedus kõrgem 2020. aastal kogutud proovides (29%) võrreldes 2019. aastaga (7%).



**Joonis 4.** Täisõvede ja poolõvede esinemine Oessaare, Killatu ja Kõiguste kudealadel 2019-2020 aastal. Nii x kui y teljel on järjestatud uuritud haugi noorjargud. Oranžid rombid tähistavad täisõve paari esinemist, roheline kolmnurk tähistab võimaliku poolõve paari esinemist.



### 3.2. Efektiivse kudekarja suuruse hinnangud

Kokku oli võimalik hinnata samasuviste haugide sugulussidemete põhjal efektiivse kudekarja suurust viiel kudealal ning kolmel juhul nii 2019. kui 2020. aastal kogutud materjalist. Proovipüükide käigus saadi kätte planeeritust väiksem arv samasuviseid haugid (Tabel 2). Nimelt oli plaanis koguda koeproovid vähemalt 50-100 noorjärgult igalt kudealalt, kuid realselt õnnestus maksimaalselt koguda 45 samasuvist haugi (Pautsaare 2019). Seetõttu on võimalik, et analüüsitud noorjärkude arv jäi väiksemaks kui on populatsioonide tegelik efektiivse kudekarja suurus  $N_{eb}$ , mille tulemusel oli ka hinnatud  $N_{eb}$  väiksem kui tegelik  $N_{eb}$ . Seda toetab ka tugeva positiivse korrelatsiooni esinemine uuritud proovide arvu ja hinnatud  $N_{eb}$  vahel (Pearsoni korrelatsioonikordaja  $r=0,723$ ,  $P<0,05$ ). Planeeritust väiksema arvu samasuviste haugide tabamise võimalikke põhjuseid käsitleme põhjalikumalt käesoleva aruande diskussiooni osas.

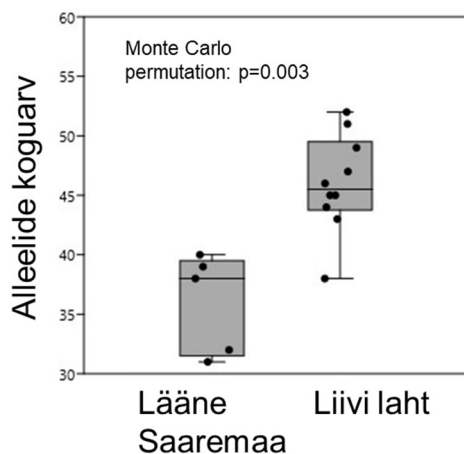
Kõige kõrgem hinnatud efektiivse kudekarja suurus sugulussidemete põhjal tuvastati Oessaare 2020. aasta valimis ( $N_{eb}=25$ , 95%CI 15-44) ning kõige madalam hinnatud kudekarja suurus esines Kõiguste 2020. aasta valimis ( $N_{eb}=12$ , 95%CI 6-28) (Tabel 2). Kuid nagu eelnevalt kirjeldasime, jäi suure tõenäosusega analüüsitud noorjärkude arv väiksemaks kui on populatsioonide tegelik efektiivse kudekarja suurus  $N_{eb}$ , mille tulemusel oli ka hinnatud  $N_{eb}$  väiksem kui tegelik  $N_{eb}$ . Seda toetavad ka markerite ahelduse põhjal hinnatud efektiivse kudekarja suurused, mis olid märgatavalt kõrgemad (Tabel 2). Selle meetodi alusel oli efektiivse kudekarja suurus kõrgeim Oessaare ja Mullutu-Suurlahe kudealadel ning väiksem Killatu järves (43,3) ja Kõiguste lahes (25,7). Kolmel juhul ei võimaldanud ahelduse puudumine markerite vahel hinnata Oessaare (2019, 2020) ja Mullutu-Suurlahe (2020) efektiivset kudekarja suurust ning seetõttu andis andmeanalüüs tulemiks, et uuritud populatsiooni suurus on lõpmatu (*ingl. k. infinite*). See illustreerib hästi geneetiliste analüüside põhjal hinnatava efektiivse populatsiooni suuruse ühte olulist piirangut. Nimelt on väga suure efektiivse populatsiooni puhul hinnatud  $N_e$  võrdlemisi ebatäpne. Samas väikse  $N_e$  väärtuste puhul on efektiivse populatsiooni suuruse hindamise täpsus suurem. See on oluline just looduskaitsest aspektist, kuna just väikeste ja ohustatud populatsioonide efektiivse populatsiooni suuruse hinnangu täpsus on kriitiline toimivate kaitsemeetmete välja töötamiseks.

**Tabel 2.** Efektiivse kudekarja suurus ( $N_{eb}$ ) ning 95% usalduspiirid ( $N_{eb}$  2.5%CI,  $N_{eb}$  97.5%), keskmine täisõvede osakaal kogu uuritud proovide hulgas (FS/n) ning efektiivse populatsiooni suurus arvatud markerite ahelduse meetodi alusel (LD\_ Ne).

Uuritud ala	Aasta	Proovide arv	Neb	Neb 2.5%CI	Neb 97.5%CI	FS/n	LD_ Ne
Pautsaare	2019	45	17	10	34	0,27	156,3
Pautsaare	2020	41	18	10	35	0,40	90,8
Killatu	2020	39	23	13	43	0,31	43,3
Oessaare	2019	32	20	11	39	0,07	lõpmatu
Oessaare	2020	41	25	15	44	0,29	lõpmatu
Mullutu-Suurlaht	2019	24	14	6	33	0,38	192,4
Mullutu-Suurlaht	2020	22	15	8	32	0,09	lõpmatu
Kõiguste	2020	17	12	6	28	0,47	25,7

### 3.3. Kudealade ja aastaklasside geneetiline muutlikkus ja diferentseerumine

Hardy-Weinbergi (H-W) test ei näidanud olulist kõrvalekallet genotüüpide sageduse tasakaalust ühegi uuritud aastaklassi või vanemkalade proovi puhul. Alleelide arv mikrosatelliidi lookustes varieerus kolmest (Elu10) kuni viieteistkümmeni (Elu76). Kiljatu vanemkalade valimis ( $n=17$ ) esines kokku kõige vähem alleele (31), samas kui Saastna lahe vanemkalade valim ( $n=28$ ) oli geneetiliselt kõige mitmekesisem (52 alleeli). Pautsaarest 2020. aastal kogutud valimis (Jpa20) oli madalaim tegelik ( $H_o=0,422$ ) ja eeldatav heterosügootsus ( $H_e=0,419$ ), kõrgeimad väärtused leiti Kõigustest püütud vanemate haugide valimis (Ako,  $H_o=0,647$ ,  $H_e=0,618$ ) (Tabel 3). Saaremaa lääneosast püütud kaladel (Killatu, Pautsaare) oli nii vanemkalade kui noorjarkude puhul geneetilise muutlikkuse tase oluliselt madalam võrreldes Liivi lahe valimitega (joonis 5). Samuti esines Lääne Saaremaa haugidel madalam alleelirikkus ning  $H_e$  ja  $H_o$  tase võrreldes Liivi lahe valimitega (kõik  $p$  väärtused alla 0,01).

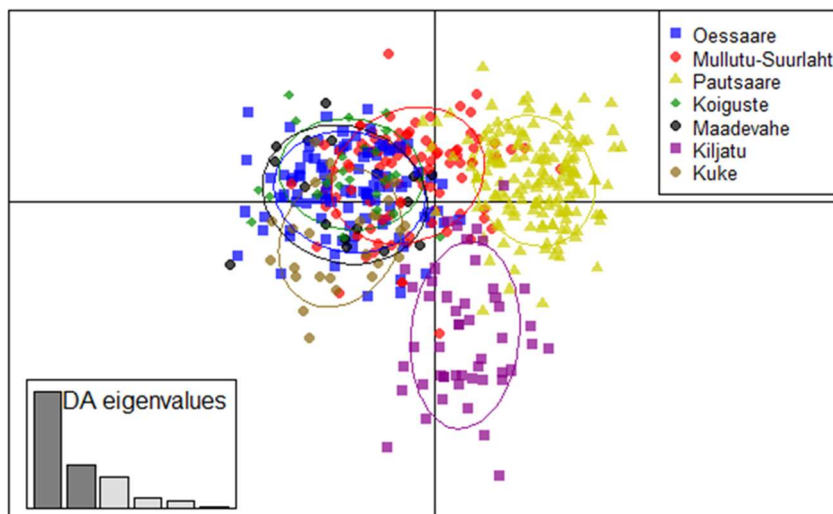


**Joonis 5.** Alleelide koguarv uuritud valimites.

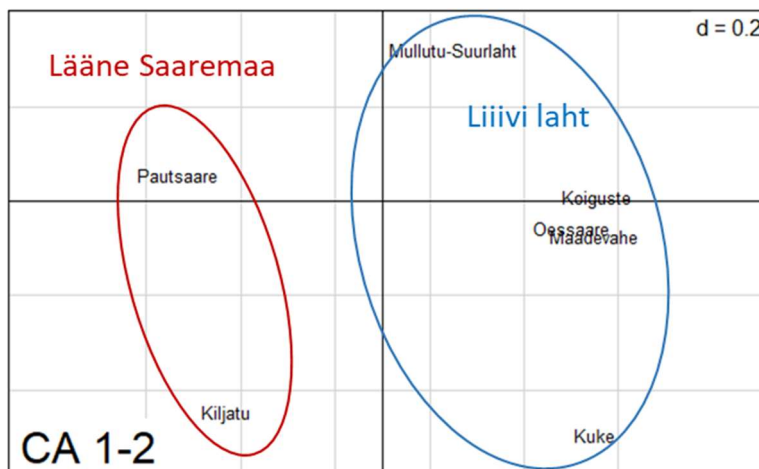


**Tabel 4.** Valimitevahelise geneetilise diferentseerumise indeks, Fst. Paksema kirjaga on märgitud statistiliselt mitteolulised Fst väärtused ( $p > 0.05$ ).

	Ako	Apa	Aki	Aoe	Amu	Aku	Jki20	Joe19	Joe20	Jmu19	Jmu20	Jpa19	Jko19	Jpa20	Jma20
Ako	0														
Apa	0,12	0													
Aki	0,114	0,055	0												
Aoe	0,039	0,124	0,112	0											
Amu	0,027	0,08	0,079	0,028	0										
Aku	0,031	0,182	0,164	0,061	0,073	0									
Jki20	0,124	0,104	<b>0,003</b>	0,134	0,111	0,149	0								
Joe19	0,017	0,149	0,119	<b>0,01</b>	0,03	0,037	0,1312	0							
Joe20	0,019	0,141	0,132	<b>0,008</b>	0,027	0,05	0,1489	0,012	0						
Jmu19	0,045	0,066	0,065	0,061	<b>0,008</b>	0,111	0,0988	0,065	0,061	0					
Jmu20	0,03	0,094	0,097	0,04	<b>-0,007</b>	0,098	0,131	0,034	0,029	<b>0,0089</b>	0				
Jpa19	0,116	<b>0,0001</b>	0,058	0,117	0,083	0,178	0,097	0,145	0,136	0,067	0,1	0			
Jko19	<b>0,013</b>	0,189	0,149	0,052	<b>0,034</b>	0,087	0,159	<b>0,025</b>	<b>0,031</b>	0,061	0,045	0,185	0		
Jpa20	0,131	<b>0,002</b>	0,077	0,147	0,095	0,206	0,123	0,167	0,156	0,079	0,106	<b>0,005</b>	0,21	0	
Jma20	<b>-0,013</b>	0,137	0,118	0,044	0,033	0,031	0,119	<b>0,018</b>	0,032	0,047	0,03	0,131	<b>0,015</b>	0,147	0



**Joonis 6.** Peakomponentanalüüs individude tasemel. Iga sümbol illustreerib uuritud kala genotüübi paiknemist kahes dimensioonis.



**Joonis 7.** Peakomponentide diskriminantanalüüs (DAPC) uuritud kudealade tasemel kahes dimensioonis.



## 4.1. Arutelu ja kokkuvõte

Läbiviidud uuringu raames hindasime samasuviste haugide sugulussidemete põhjal efektiivse kudekarja suurust Saaremaa viiel kude- ja turgutuslal 2019. ja 2020. aastal kogutud materjalist. Planeeritud oli koeproovid koguda vähemalt 50-100 noorjärgult igalt kudealalt, kuid reaalselt õnnestus ühel hooajal maksimaalselt koguda 45 samasuvist haugi ühest kudepiirkonnast (Pautsaare 2019). Seetõttu on võimalik, et analüüsitud noorjärkude arv jäi väiksemaks kui on populatsioonide tegelik efektiivse kudekarja suurus  $N_{eb}$ , mille tulemusel oli ka hinnatud  $N_{eb}$  väiksem kui tegelik  $N_{eb}$ . Planeeritust väiksema arvu samasuviste haugide tabamise võimalikke põhjuseid on mitmeid. Esiteks, vähemalt teoreetiliselt on võimalik, et uuritud kudealadel on nii efektiivse kudejate arv kui ka noorjärkude tihedus väga väike ning seetõttu tabati ka välitööde käigus väike arv samasuviseid haugid. Samas lähedalt suguluses olevate noorjärkude sagedus enamikes uuritud punktides ei viita sellele, et kudejate arvukus on väga väike. Lisaks ei viita väga väikesele kudejate arvule stabiilse geneetilise struktuuri esinemine. Teiseks potentsiaalseks võimaluseks on, et väikese arvu haugi noorjärkude tabamise põhjus on püügimetoodika suhteliselt madal efektiivsus uuritud aladel. Nimelt kasutati magevees noorkalade püügiks elektripüügi agregaatid ning riimvees maimunoota. Samas, arvestades, et lisaks haugidele saadi suur hulk teisi kalaliike (nt. ogalik) ei ole püügimetoodika tõenäoliselt probleemiks sobiva valimi kogumisel. Kolmandaks võimaluseks on, et noorjärkude madal arvukus on tingitud ogaliku kõrge arvukusest, mille tulemusena ogalik hävitab suure osa haugi marjast või eelvastsetest vahetult pärast majaterast koorumist. Hiljuti on Rootsi rannikumeres kirjeldatud ogaliku biomassi plavatuslik tõusu, mis algas 2000. aastatel ja mille tulemusel on ogalik välja tõrjunud haugi ja ahvena nende tüüpilistest elupaikadest (Ljunggren jt. 2010, Eklöf jt. 2020). Sarnane protsess toimub tõenäoliselt ka Eesti rannikumeres kuid täpsemaid andmeid siiani puuduvad. Seega võib oletada, et haugi noorjärkude madala arvukuse üheks võimalikuks teguriks on ogaliku kisklus. Selleks et paremini mõista ogaliku rolli teiste kalaliikide arvukuse reguleerijana oleks äärmiselt oluline läbi viia täiendavaid uuringuid. Neljanda võimaliku faktorina võiks välja tuua haugi noorjärkude potentsiaalne väljaränne uuritud kudealadelt. Nimelt viidi välitööd läbi vahemikus 18.6-15.7.2019 ning 16.6-30.7.2020 ja püütud samasuvised haugid olid keskmiselt 92.7 mm pikkused (TL, minimaalne 43 mm, maksimaalne 153 mm). Kirjanduse andmetel aga lahkeb enamik (80–95%) samasuviseid haugid esimese elukuu jooksul pärast koorumist üleujutatud lammialadelt väiksemana kui 60 mm (Nilsson jt. 2014). Seega on võimalik, et madal haugi noorjärkude tihedus on vähemalt osaliselt tingitud noorkalade lahkumisest kudealadelt enne proovipüükide läbiviimist. Seetõttu on oluline edaspidi hinnata haugi noorjärkude arvukust ning ogaliku mõju just vahetult pärast koorumist.

Põhinedes täisõvede sageduse hinnangule oli efektiivne kudekarja suurus väikseim Kõiguste lahes, suurim Mullutu-Suurlahes ja Oessaare lahes. Arvestades uuritud kudealade suurust on selline tulemus küllaltki ootuspärane. Mõnevõrra üllatav oli märkimisväärse aastevahelise varieeruvuse esinemine täisõvede sageduses. Nii Oessaare kui Mullutu-Suurlahe proovides esines näiteks täisõvede sagedus, vastavalt 7-29% ja 9-38% ulatuses. Seega võib geneetiliste andmete põhjal järeldada, et erinevatel aastatel esineb kudejate arvukuses märkimisväärne muutlikkus.

Kas tegemist on kliimaatilistest tingimustest põhjustatud muutlikkusega (n. veetaseme erinevused, temperatuur, tuulesuund) või on tegemist aastatevahelise kudejate arvu reaalse kõikumisega on käesoleva uuringu põhjal raske tuvastada. Eeldades, et kliimaatilised tegurid mõjuvad erinevate kudealadele sarnaselt (n. veetase või temperatuur) võib järeldada, et kudejate arvukuse variatsioon ei ole tõenäoliselt seotud üldiste kliimaatiliste teguritega. Samas alleelisageduste suurt kõikumist 2019. ja 2020. aasta samasuviste materjali võrdlus ei tuvastanud, mis näitab, et kudejate arv on piisavalt suur tagamaks populatsiooni struktuuri stabiilsust.

Lisaks sugulussidemete hindamisele viisime läbi esmakordselt rannikumere haugil populatsioonigeneetilise analüüsi, mille tulemusena avastasime, et uuritud Saaremaa kudealad eristuvad üksteisest oluliselt. Seega võib väita, et tänu kudepaigatruudusele ja juhuslikule geenitriivile on Saaremaa rannikumeres haug eristunud omavahel geneetiliselt alampopulatsioonideks. Kõige suuremad geneetilised erinevused esinesid Lääne-Saaremaa (Pautsaare, Killatu) ja Liivi lahe kudealade vahel (Mullutu-Suurlaht, Oessaare, Kõiguste, Saastna laht). See näitab, et nende kahe ala vaheline geenivahetus on minimaalne, kusjuures Lääne-Saaremaa haugi asurkonnad on oluliselt madalama muutlikkusega kui Liivi lahe populatsioonid. Oluliste geneetiliste erinevuste esinemine kudealade vahel omakorda tähendab, et haugi kaitseks on oluline kohalike kudealade kaitse ja taastamine. Samuti on äärmiselt tähtis vältida geneetiliselt erinevate alampopulatsioonide segamist ning võõra geneetilise päritoluga kalade asustamist.

## 4.2. Soovitused efektiivse kudekarja suuruse hindamiseks

- 1) Efektiivse kudekarja suuruse hindamiseks DNA-põhise analüüsi põhjal on vajalik piisava arvu varieeruvate markerlookuste analüüs. Enamikul juhtudel on 10-20 kõrge muutlikkusega mikrosatelliidilookust või 100-200 SNP lookust piisav efektiivse kudekarja suuruse hindamiseks sugulussidemete meetodit kasutades. Samas suurema arvu markerite kasutamine vähendab efektiivse kudekarja suuruse hinnangu ebatäpsust (väiksemad usalduspiirid). Markeripaneeli sobivust efektiivse kudekarja suuruse hindamiseks on võimalik testida läbiviidava pilootprojekti raames analüüsides väikset arvu indiviide (50-100).
- 2) Efektiivse kudekarja suuruse hindamiseks DNA-põhise analüüsi põhjal on vajalik piisava arvu noorjärkude analüüs, mis on kogutud juhuslikult kogu uurimise all olevast piirkonnast. Soovitavalt peaks uuritud noorkalade arv olema lähedane või suurem võrreldes tegeliku efektiivse populatsiooni suurusega, mis on paraku enne uuringute läbiviimist teadmata. Juhul kui uuritud noorkalade arv on väiksem kui tegelik efektiivne populatsiooni suurus, alahindab sugulussidemete meetod tegelikku  $N_{eb}$  väärtust. Sellisel juhul on mõistlikum kasutada markerite ahelduse meetodit efektiivse kudekarja suuruse hindamiseks. Haugi kudekarja suuruse hindamiseks kudeladelt on soovitatav koguda koeproovid vähemalt 100 noorkalalt mis võimaldab tuvastada

kudealad, kus efektiivne kudekarja suurus on väike (<100).

- 3) Selleks, et hinnata kui suur on noorjärgudelt kogutud proovide arvu mõju efektiivse populatsiooni suuruse hinnangule, on soovitatav teha sugulussidemete analüüs olemasolevate proovide alavalimist. Näiteks kui valimi suuruseks on 100 noorjärku, siis on soovitatav hinnata efektiivse populatsiooni suurust 40, 60 ja 80 suurusest alavalimist (tagasipanekuga juhuvalim, *ingl. k. bootstrap*). Sugulussidemete analüüsi on soovitatav igas juhuslikult konstrueeritud alavalimis viia läbi mitu korda (5-10), et hinnata juhuslikkuse osa Neb hindamisel.
- 4) Juhul kui noorjärgudelt kogutud proovide arv on väiksem kui eeldatav efektiivse populatsiooni suurus, on täisõvede (õdede ja vendade) sagedus proovis potentsiaalselt informatiivne parameeter, mis peegeldab efektiivse kudekarja suurust. Seega annab täisõvede sageduse hindamine isegi küllaltki väikese valimi puhul olulist informatsiooni kudekarja suuruse kohta.
- 5) Vaatamata mitmetele eelpooltõstatatud võimalikele kitsaskohtadele on DNA-põhine meetodika sageli ainuvõimalik ning efektiivne viis, et objektiivselt hinnata kudekarja suurust.

## 5. Kasutatud kirjandus

- Ackerman MW, Hand BK, Waples RK, Luikart G, Waples RS, Steele CA, Garner BA, McCane, Campbell RM (2017) Effective number of breeders from sibship reconstruction: empirical evaluations using hatchery steelhead. *Evol Appl.* 2017 Feb; 10(2): 146–160.
- Berggren H, Nordahl O, Tibblin P, Larsson P, Forsman A (2016) Testing for Local Adaptation to Spawning Habitat in Sympatric Subpopulations of Pike by Reciprocal Translocation of Embryos. *PLoS ONE* 11(5): e0154488.
- Debes PV, et al. (2018) Quantitative genetic variation in, and environmental effects on, pathogen resistance and temperature-dependent disease severity in a wild trout. *American Naturalist*, 190: 244–265.
- Engstedt O, et al. (2010) Assessment of natal origin of pike (*Esox lucius*) in the Baltic Sea using Sr:Ca in otoliths. *Environ. Biol. Fishes*, 89: 547–555.
- Eriksson BK, Ljunggren L, Sandström A, Johansson G, Mattila J, Rubach A, Råberg S, Snickars M (2009) Declines in predatory fish promote bloom-forming macroalgae. *Ecological Applications* 19: 1975-1988.
- Erm V, Rannak L, Sõrmus I, Štšukina I (1970) Väinamere kalastik. In: Kumari, E. (ed.) Lääne-Eesti rannikualade loodus. Tallinn: Valgus, pp. 61–80.
- Hansen, M.M., Taggart, J.B., and Meldrup, D. 1999. Development of new VNTR markers for pike and assessment of variability at di- and tetranucleotide repeat microsatellite loci. *J. Fish Biol.* 55: 183–188.
- Hare MP et al. (2011) Understanding and estimating effective population size for practical application in marine species management. *Conservation Biology* 25:438–449.

- Jones OR, Wang J (2010) COLONY: a program for parentage and sib-ship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* 10:551–555.
- Laikre L, et al. (2010) Neglect of genetic diversity in implementation of the convention on biological diversity. *Conservation Biology* 24:86–88.
- Launey, S., Krieg, F., Morin, J., and Laroche, J. 2003. Five new microsatellite markers for Northern pike (*Esox lucius*). *Mol. Ecol. Notes*, 3: 366–368.
- Ljunggren L, et al. (2010) Recruitment failure of coastal predatory fish in the Baltic Sea coincident with an offshore ecosystem regime shift. *ICES J. Mar. Sci.* 67: 1587–1595.
- Miller, L.M., and Kapuscinski, A.R. 1996. Microsatellite DNA markers reveal new levels of genetic variation in Northern pike. *Trans. Am. Fish. Soc.* 125: 971–977.
- Nilsson J (2006) Predation of northern pike (*Esox lucius* L.) eggs: a possible cause of regionally poor recruitment in the Baltic Sea. *Hydrobiologia* 553: 161-169.
- Nilsson J, Engstedt O, Larsson P (2014) Wetlands for northern pike (*Esox lucius* L.) recruitment in the Baltic Sea. *Hydrobiologia* 721(1), 721:145–154.
- Ozerov M, et al. (2015) Use of sibling relationship reconstruction to complement traditional monitoring in fisheries management and conservation of brown trout. *Conserv Biol.* 4:1164-1175.
- Rice, J. C., and Legace, E (2007) When control rules collide: a comparison of fisheries management reference points and IUCN criteria for assessing risk of extinction. – *ICES Journal of Marine Science*, 64: 718–722.
- Rohtla M, et al. (2012) Early life migration patterns of Baltic Sea pike *Esox lucius*. *J. Fish Biol.* 80: 886–893.
- Rohtla M (2015) Otolith sclerochronological studies on migrations, spawning habitat preference and age of freshwater fishes inhabiting the Baltic Sea. PhD Thesis, University of Tartu.
- Schwartz MK, et al. (2007) Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *TREE* 22:25–33.
- Sloss, B.L., Franckowiak, R.P., and Murphy, E.L. 2008. Development of new microsatellite loci and multiplex reactions for muskellunge (*Esox masquinongy*). *Mol. Ecol. Res.* 8: 811–813.
- Wennerström L, et al. (2017) Temporally stable, weak genetic structuring in brackish water northern pike (*Esox lucius*) in the Baltic Sea indicates a contrasting divergence pattern relative to freshwater populations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 74: 562–571.
- Wang J (2009) A new method for estimating effective population sizes from a single sample of multilocus genotypes. *Molecular Ecology* 18:2148–2164.
- Wright S (1969) *Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 2, The Theory of Gene Frequencies*. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Waples RS, Do C (2008) Ldne: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Mol Ecol Resour* 8(4):753-6.