

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT  
ZOOLOOGIA OSAKOND  
HÜDROBIOLOOGIA ÕPPETOOL

**Marju Kaljuste**

**RÄIME (*CLUPEA HARENGUS MEMBRAS*)  
GENEETILINE MITMEKESISUS LÄÄNEMERES**

Magistritöö

Juhendajad: Urmas Saarma, PhD

Tiit Raid, PhD

TARTU 2010

## SISUKORD

1. Sissejuhatus.....	3
2. Kirjanduse ülevaade.....	4
2.1. Ülevaade heeringlaste sugukonnast.....	4
2.2. Läänemere asustamine heeringa poolt.....	6
2.3. Räime rühmitused Läänemeres.....	8
2.4. Geneetilise struktuuri uuringud.....	10
3. Materjal ja meetodika.....	18
3.1. Materjal.....	18
3.2. Genoomse DNA eraldamine.....	20
3.3. Mikrosatelliitide analüüs.....	21
3.4. Populatsioonistruktuuri ja geneetilise mitmekesisuse analüüs.....	23
4. Tulemused.....	24
4.1. Genoomse DNA eraldamine.....	24
4.2. Mikrosatelliitide analüüs.....	24
5. Arutelu.....	28
Kokkuvõte.....	31
Summary.....	32
Tänuavaldus.....	33
Kirjanduse nimestik.....	34
Lisad.....	40

# 1. SISSEJUHATUS

Heeringalised (*Clupeiformes*) on erinevate teadlaste tähelepanu pälvinud juba üle saja aasta. Kõiki heeringalisi iseloomustab äärmiselt suur liigisisene heterogeensus, mis seisneb arvukate ruumiliselt rohkem või vähem eraldunud rühmituste olemasolus. Läänemere heeringas e. räim, keda käsitletakse atlandi heeringa alamliigina (*Clupea harengus membras* L.), ei erine selles suhtes seltsi ülejäänud liikmetest. Kogu Läänemere ulatuses eristatakse bioloogiliselt ja morfoloogiliselt erinevaid räimerühmitusi. Nende rühmituste eristumine on tingitud eelkõige keskkonnatingimuste varieeruvusest ja kudealade paigutusest. Eestis on räime kui Läänemere tähtsaimat tööduskala uuritud juba aastakümneid. Eesti vetes eristatakse räimel kaht sesoonset rühma – kevad- ja sügiskuduräime. Mõlemad rühmitused jagunevad väiksemateks lokaalkarjadeks, mis erinevad üksteisest kudemis-, toitumis- ja talvitumisalade, kasvutempo ja kasvu iseloomu ning ka morfoloogiliste tunnuste poolest (Ojaveer, 1988 ja 2003; Rannak, 1988). Räimevarude jätkusuutlik majandamine nõuab aga teaduslikult läbitöötatud andmeid erinevate räimepopulatsioonide geneetilise mitmekesisuse, populatsioonide geneetilise segunemise ning selle ulatuse kohta; samuti fülogeneetilise seotuse kohta teiste Läänemere, aga ka kaugemate vesikondade räimepopulatsioonidega. Räime kui majanduslikult tähtsa kalaliigi uurimiseks on oluline rakendada parimaid meetodeid, mis võivad tuua selguse varem lahendamata probleemidele nagu räimevarude geneetiline pagas Eesti vetes ning selle kaitsmine nii teaduslikust kui majanduslikust aspektist lähtudes. Samuti saaks sellise uuringu tulemusi rakendada globaalsemalt räime fülogeograafia uurimiseks.

Molekulaarbioloogiliste meetodite rakendamine kalade populatsioonigeneetika uurimisel on muutunud aasta-aastalt üha olulisemaks. Mikrosatelliitide kui kõrge polümorfusega geneetiliste markerite abil on saadud usaldusväärseid tulemusi näiteks lõhilaste (Vasemägi *et al.*, 2001; Hansen *et al.*, 2000), kuid ka heeringlaste (O'Connell *et al.*, 1998a; Shaw *et al.*, 1999; Jørgensen *et al.*, 2005) populatsioonide eristamisel. Seetõttu on mikrosatelliitmarkereid kasutatud ka käesolevas töös Eesti vete räimepopulatsioonide tuvastamiseks.

Töö eesmärk oli välja töötada optimaalne meetod räime geneetilise mitmekesisuse uurimiseks Eesti vetes ja teha kindlaks siinse räimepopulatsiooni struktuur ja geneetiline mitmekesisus, sealhulgas tuvastada, kas mikrosatelliitmarkerite abil on võimalik leida geneetilist erinevust kirjanduses mainitud kevad- ja sügiskuduräime, samuti kevadräime erinevate rühmituste – mere- ja laheräime vahel (Ojaveer, 1988 ja 2003; Rannak, 1988).

## 2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### 2.1. ÜLEVAADE HEERINGLASTE SUGUKONNAST

Heeringlaste (*Clupeidae*) sugukond, mis hõlmab rohkem kui 50 perekonda ligemale paarisaja liigiga, on levinud kõikides maailma meredes ja ookeanides. Kõige rikkalikumalt (37 perekonda ja 130 liiki) on nad esindatud troopikavöötmes. Subtroopikas ja parasvöötmes on neid märksa vähem. Arktilistes meredes on esindatud ainult heeringate (*Clupea*) perekonda kuuluv idaheeringas (*C. pallasii*) (Rannak, 1988).

Kõikidel laiuskraadidel, kus heeringlasi esineb, on enamik neist mereasukad. Parasvöötmes esineb ka mõningaid siirdeheeringlasi, kuid nende elu on samuti tihedalt merega seotud, ainult kudema suunduvad nad magevette. Eesti merevetest on üksikute isenditena leitud siirdekala vinträime (*Alosa fallax*) (Rannak, 1988).

Heeringlaste sugukonna algset lähtepunkti tuvastada püüdes on kõne alla tulnud troopikavööde (Svetovidov, 1952). Sealse kalafauna eellased asustasid vana- ja keskaegkonna vältel eksisteerinud nn. Teetise merd. Too meri lahutas põhja- ja lõunapoolkera mandreid, ulatudes Vaikse ookeani idaosast üle Kesk-Ameerika, Põhja-Aafrika ja Lõuna-Euroopa ning India ookeani Vaikse ookeani lääneossa. Seoses maakoore kerkimisega uusaegkonnas ahenes Teetise meri tunduvalt ning jagunes osadeks. Panama maakitsuse tekkega katkes ühendus Vaikse ookeani ja Atlandi ookeani vahel; Põhja-Aafrikast Araali mereni ulatunud suur sisemeri jagunes Vahemere idaosaks, Mustaks mereks ja Kaspia mereks. Keskkonnatingimuste erinevused uutes veekogudes põhjustasid heeringlaste eristumise. Pelaagilise eluviisiga heeringlased vajavad kudemiseks rannikulähedast madalmerd. Leidmata soodsaid kudemistingimusi meres, siirdusid nad magevette. Suurte veerikaste jõgede ja vesikondade olemasolu Lääne-Aafrikas, Kagu-Aasias ja Ida-Ameerika troopilistes piirkondades soodustas suure hulga mageveeheeringlaste endeemsete perekondade ja liikide kujunemist. Mageveeheeringlased elavadki põhiliselt troopikavöötmes (Svetovidov, 1952).

Heeringate (*Clupea*) perekonna geograafiliseks levimiskeskmeiks peetakse Atlandi boreaalse vöötme ida-ameerika ala (Svetovidov, 1952).

Heeringad elavad põhjapoolkeral parasvöötme vetes (boreaalne regioon), Põhja-Jäämere ääremeres ja Tšiili ranniku lähedal. Heeringa perekonnas tuntakse kolme liiki: atlandi heeringas (*Clupea harengus*), vaikse ookeani e. idaheeringas (*Clupea pallasii*) ja tšiili

heeringas (*Clupea bentincki*). Läänemere heeringat e. räime (*Clupea harengus membras*) peetakse atlandi heeringa alamliigiks (Rannak, 1988).

Atlandi ja idaheeringas erinevad teineteisest nii morfoloogiliste kui bioloogiliste tunnuste poolest. Morfoloogialt peetakse tähtsaimaks selgrootülide erinevat arvu – atlandi heeringal on rohkem (55-58) selgrootülisid kui idaheeringal (52-55) (Rannak, 1988).

Atlandi heeringa levila ühtib atlantilise päritoluga vetega. Levila ida- ja põhjapiiriks on polaarfront, so. Atlandi soojade hoovuste ja Põhja-Jäämere külmade hoovuste kokkupuutepiir. Idaheeringas elab talvel peaaegu kogu oma levila ulatuses jääkatte all. Need kaks heeringaliiki erinevad ka muude bioloogiliste omaduste poolest, nagu näiteks kudemisalad ja -ajad (Rannak, 1988).

Atlandi ja idaheeringa erinev kromosoomide arv – vastavalt 54 ja 52 (2n) – tõestab, et nende morfomeetrilised ja bioloogilised erinevused on pärilikult kinnistunud (Rannak, 1988). Usutakse, et nende liikide eristumine kujunes väga pika aja jooksul, sõltudes eeskätt kliimaatilistest tingimustest ja vesikondade kujunemisest tertsaaris (algusega ~30 miljonit aastat tagasi), mil Maa kliima muutus jahedamaks koos üha sagenevate temperatuurikõikumistega. Viimase kolme miljoni aasta jooksul on Maa kliima läbi teinud suuri muudatusi, viies ühtlasi viimaste suuremate jääaegadeni. Selle vältimatuks tagajärjeks paljudele elusorganismidele olid suured muutused levikus, mis aga boreaalsetel, mõõduka kliimaga ja troopilistel aladel avaldusid erinevalt. Paljud liigid surid suuremal osal oma levialast välja; mõned asustasid uusi elupaiku, mõned säilitasid oma liigi väikeses refuugiumis ning hiljem laiendasid leviala uuesti – ning kõik see toimus mitmeid kordi järjest (Hewitt, 2000).

Svetovidov (1952) viitab asjaolule, et Atlandi ookeani praeguse parasvöötme-kliimaga aladel valitses alam-tertsiaaris (~65 miljonit aastat tagasi) troopiline kliima. Heeringad, tursad ja teised boreaalsed kalad hoidusid siis polaarmere jahedamatesse vetesse, kus oli küllaldane sügavus ja neile sobiv mereline keskkond. Kliima ulatuslikul jahenemisel ülem-tertsiaaris (~10 miljonit aastat tagasi) siirdusid boreaalsed heeringad ja tursad Atlandi ookeani põhjaossa, mitte Vaiksesse ookeani, sest praeguse Beringi väina kohal laius siis maismaasild. Svetovidov peab tõenäoliseks, et heeringas asustas Vaikse ookeani pliotseenis (2-6 miljonit aastat tagasi), mil Beringi väina kohal oli toimunud maakoore vajumine ja meri taastunud; ka oli tollane kliima soojem kui jääajajärgsel perioodil. Tõenäoliselt oli juba enne seda eristunud soojalembesem ookeaniheeringas ja jahedamaveeline, riimveelembeline rannikuheeringas. Viimane oli arktilise mere tingimustes suuteline siirduma Vaiksesse ookeani.

Arktilisest merest Vaikse ookeani parasvöötmesse sattudes levis heeringas siin ulatuslikul alal: piki Aasia rannikut Kollase mereni ning Ameerika rannikul Californiani. Kogu siinse levila ulatuses säilitas ta arktilise rannikumere heeringa bioloogilise omapära. Pärilike omaduste konservatiivsuse tõttu ei tekkinud siin rannikust kaugematel meremadalatel ega mandrinõlvadel suvel ja sügisel kudevaid heeringarühmitusi. See heeringas ei soorita pikki rändeid, ta toitub ja talvitub ranniku lähedal (Rannak, 1988).

Kliima järsu muutumise tõttu viimasel suurel jääajal elas atlandi heeringas oma praegusest levilast mõnevõrra lõuna ja lääne pool, mandrilava ookeani soojade hoovuste mõjupiirkonnas. Jäämasside sulamise ja jääserva taandumisega põhja suunas kaugenes ka nende rikkalik toitumisala (turgutusala) külmade ja soojade vete piiril (Rannak, 1988). Peetakse tõenäoliseks, et just sellel geoloogilisel ajavahemikul eristus kaks heeringa kudemisrühma: kevadel ja sügisel kudejad. Kevad- ja sügiskuduheeringad on ökoloogiliselt isoleeritud, nende kudemisaja erinevused põhinevad eeskätt kudemistemperatuuri erinevusel (Rannak, 1988).

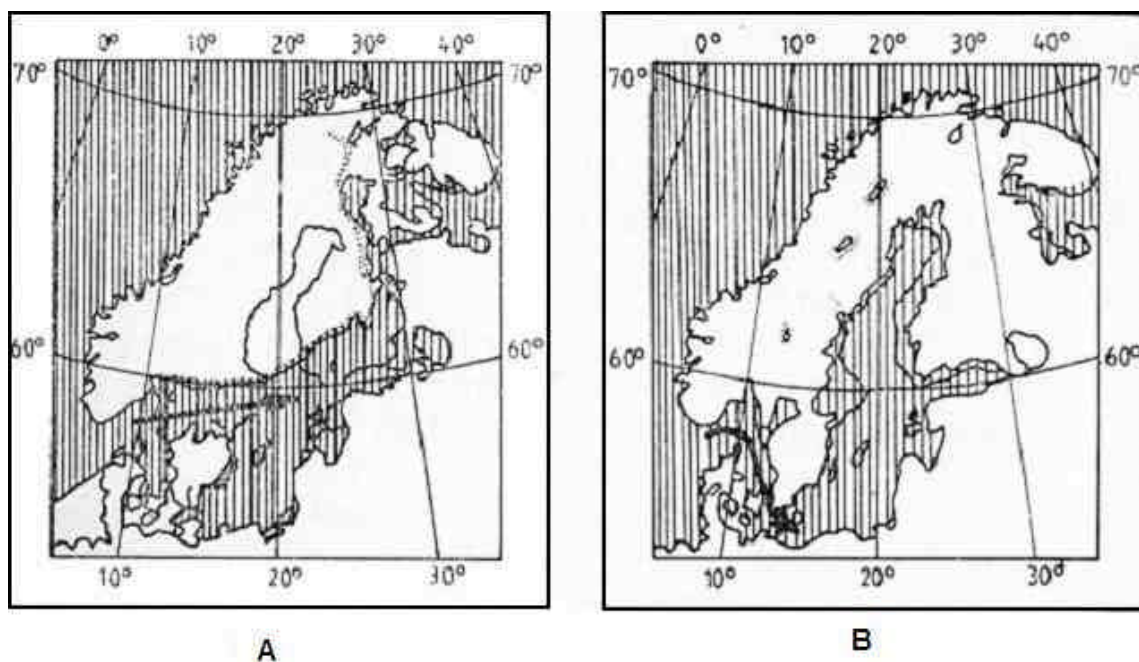
H. Einarsson (1958) jaotab atlandi heeringa kaheks alamliigiks: atlandi ehk ookeaniheeringas (*Clupea harengus oceanicus*) ja põhjamere šelfiheeringas (*Clupea harengus harengus*). Ookeaniheeringas elutseb ookeanis ja külastab mandrinõlva (šelfiala) kudemisajal; põhjamere heeringas elab kogu oma elu mandrilaval. Kumbki alamliik moodustab omakorda mikroalamliike ja väikesi lokaalpopulatsioone rannikuvetes.

## 2.2. LÄÄNEMERE ASUSTAMINE HEERINGA POOLT

Läänemere heeringa ehk räime rühmituste praegune levik ja nende bioloogilised iseärasused on seotud jääajajärgse Läänemere vesikonna kliima ja hüdroloogia muutustega. Teadlased on seisukohal, et Läänemere asustamine heeringa poolt võis toimuda jääajajärgse perioodi erinevatel aegadel, kusjuures kevad- ja sügiskuduräime rühmitused immigreerusid eraldi (Munthe, 1956). Läänemere vabanemine jääst algas umbes 15 tuhat aastat tagasi, kuid kõige viimane osa – Botnia laht – vabanes umbes 9 tuhat aastat tagasi (Svetovidov, 1952).

Atlandi heeringa sissetung Läänemerre võis alata peale jää taandumist Atlandi ookeani ja Läänemere vahelise ühenduse moodustumisel ning Läänemeres heeringale sobivate elutingimuste tekkimisel (Ojaveer, 1988; joonis 1). Läänemere ühendus merega üle Närke väina Kesk-Rootsis kujunes välja umbes 10 tuhat aastat tagasi, mille tagajärjel tungis merevesi Läänemere nõkku. Preboreaalse e. hilisglatsiaalse Joldiamere staadiumis ümbritses Skandinaavia poolsaart polaarmeri. Luustikuleidude järgi on kindlaks tehtud, et selles

preboreaalses Joldiameres oli heeringas kindlasti olemas (Munthe, 1956). Vaatamata preboreaalsele kliimale domineerisid Läänemere faunas sel ajal tõenäoliselt arktilised ja arktilis-boreaalsed liigid (Järvekülg, 1979). Seetõttu on alust arvata, et selles meres olid esindatud üksnes kevadkuduräimed (Ojaveer, 1988).



**Joonis 1.** Heeringa migreerumine Läänemerre L. Rannaku (1988) järgi. A – Joldiamere staadium; B – Litorinamere staadium. Heeringa sissetungi võimalikku teed märgib tume nool üle toonase Närke väina (A) või üle Taani väinade (B).

Läänemere arengu järgmises staadiumis – Antsülusjärves – on räime olemasolu kaheldav, kuna tema embrüonaalseks arenguks on vajalik vee minimaalne soolsus 2-3% (Ojaveer, 1988). Munthe (1956) on seisukohal, et olles kord juba Läänemerre immigreerunud, elas heeringas siiski ka Antsülusjärves edasi. Levinud on seisukoht, et see heeringarühmitus, kes elutses Läänemeres Joldiamere perioodil ja elas üle Antsülusjärve perioodi kas Läänemeres või väljaspool seda, Põhjamere magedaveelises lahes, andis alguse praegustele laheräimedele (Ojaveer, 1988).

Maailmamere taseme tõus atlantilise perioodi alguses 8000 aastat tagasi avas Antsülusjärvele väljapääsu Taani väinade piirkonnas. Sellele järgnes soolaste vete sissevool Atlandi ookeanist, mis tungisid üle mandreid lahutava maasilla, moodustasid Põhjamere, tõrjusid Jäämere põhja suunas ning suundusid Läänemere nõkku koos soojalembese ja

eurühaliinse kalastikuga. Sellel Läänemere ajaloo kõige soolasemal ja soojemal, samuti avaraima ühenduse perioodil, Litoriaamere staadiumis umbes 5000 aastat tagasi, immigrerus Läänemerre tõenäoliselt sügiskuduheeringas (Munthe, 1956). Ka osasid Läänemere kevadräimi seostatakse hilisema immigratsiooniga – eelkõige Läänemere lääneosa räimed (Bornholmi saarest läänes), kes koevad soolsusel mitte alla 5‰ ning ei katkesta ka sidet kõrgema soolsusega piirkondadega (nt. rügeni heeringas). Tõenäoliselt aga just tollal leidsid tee Läänemerre ka praeguste mereräimede eelkäijad (Rannak, 1988). Võib oletada, et Läänemeres kohastusid mitte nende populatsioonide esindajad, kes olid hästi adapteerunud suhteliselt konstantsetele keskkonnatingimustele, vaid pigem eurütermsete ja eurühaliinsete rühmituste esindajad (Ojaveer, 1988). Ka praegusel ajal tuleb ebastabiilsete keskkonnatingimustega piirkondades (nt. Norra fjordid, Taani väinad) ette heeringarühmitusi, kes on kohastunud vahelduvatele tingimustele (Svetovidov, 1952).

Läänemere heeringa demograafilise ajaloo kirjeldamiseks kasutatakse praegu kaht alternatiivset versiooni: 1) astmeline kolonisatsioon Põhjamerest Läänemerre või 2) sekundaarne kontaktitsoon kahe algse populatsiooni vahel – üks Põhjamerest ja teine Läänemerest – kes koloniseerisid astmeliselt nende vahele jääva üleminekutsooni (Gaggiotti *et al.*, 2009).

### 2.3. RÄIME RÜHMITUSED LÄÄNEMERES

Läänemeres, nagu ka naaberpiirkondades Kirde-Atlandis, esineb kaks primaarproduktiooni maksimumi – kevadine ja sügisene. E. Ojaveeri (1988) arvates võimaldas just see ka Läänemeres kevad- ja sügisträime kohastumist. Ajalised ja ruumilised erinevused primaarproduktiooni dünaamikas soodustavad erinevuste teket erinevate piirkondade räimede vahel. Seda loetakse ka räime lokaalpopulatsioonide eraldumise põhjuseks (Ojaveer, 1988).

Kevad- ja sügisträim moodustavad Läänemeres iseseisvaid rühmitusi, mis praktiliselt ei segune, kuna nende suguproduktid küpsevad eri aastaegadel (Ojaveer, 1981 ja 1988). Läänemere lääne-, lõuna- ja keskosas, kus produktiivsuse maksimumid on nii ajalisel kui ka ruumiliselt hästi jaotunud, on kevad- ja sügisträime sigimine selgelt eraldunud. Kuid põhjaosas, kus primaarproduktiooni maksimumid on üksteisele lähemal, toimub ka kevad- ja sügisträime rühmituste kudumine ajalisel teineteisele lähemal. Kui ilmastikutingimused kalduvad kõrvale mitmeaastasest keskmisest, siis osad räimed ühest rühmitusest võivad kudedada koos teise rühmituse osade isenditega. Seejuures hoiab suure hulga hübriidide tekke



ära gameetide omaduste halvenemine väljaspool normaalset sigimisaega (Ojaveer, 1981 ja 1988).

Kevad- ja sügiskuduräime peamised erinevused bioloogias E. Ojaveeri (1988) andmetel on järgmised:

- atlandi kevadkuduheeringas ning kevadkuduräim koevad palju madalamal temperatuuril, kuid kevadkuduräim veel ka palju madalamal soolsusel kui sügiskuduheeringas. Erandiks osutub kevadkudu laheräim, kes seoses kohastumisega lahe keskosa spetsiifiliste tingimustega koeb suhteliselt kõrgel temperatuuril.
- kevadräime vastseline areng toimub palju kõrgema ja kiiremini tõusva temperatuuri tingimustes ja selle kestus on lühike. Sügisträime vastseline areng toimub palju madalamal temperatuuril, kestab märksa kauem ja metamorfoos algab suurema kehapiikkuse juures kui kevadräimel.
- suurima suremuse perioodil – üleminekul eksogeensele toitumisele ja vastselise arengu ajal – toituvad kevad- ja sügisträimed erinevatest noortest kopepoodidest, kes ilmuvad vastavalt pärast kevadist ja varasügisest primaarproduktiooni maksimumi.

Sarnaselt atlandi kevad- ja sügiskuduheeringale erinevad ka kevad- ja sügiskuduräim terve rea morfoloogiliste tunnuste poolest – pea kuju, silma suurus, kehakuju, selja värvus, uimede asetus; selgoolülide, rinnauime kiirte ja lõpusepiide arv, otoliidi struktuur. Arvatakse, et morfoloogilised erinevused kevad- ja sügisträime vahel varieeruvad piirkonniti (Ojaveer, 1988). Samuti on erinevad kevad- ja sügiskuduräime, aga ka lokaalpopulatsioonide – mere- ja laheräime migratsioonimustrid (Aro, 1989).

Seoses Läänemere põhjareljeefi iseärasuste, hoovuste süsteemi, veemassi kihistumise, piiratud ookeaniühenduse ja suure ulatusega põhja-lõuna suunas on keskkonnatingimused olnud erinevatel aegadel võrdlemisi erinevad. Nende geograafiliselt või hüdroloogiliselt piiritletud, eraldiasetsevate piirkondade tulemusena tekkisid lokaalsed rühmitused, mis erinevad üksteisest bioloogiliste parameetrite poolest (Ojaveer, 1988). Lokaalpopulatsioonide püsimise olulisim looduslik eeldus on merealade isolatsioon, püsivad toitumisalad ja nende läheduses paiknevad kudemis- ja talvitumisalad (Rannak, 1988). Seotus kindlate koelmutega (nn. koelmuinstinkt) võib tagada ka geneetilise eristatuse. Läänemere rannajoone konfiguratsioon ja merepõhja morfoloogia on soodsad räimepopulatsioonide kujunemiseks (Rannak, 1988). Sigimistsükkel, kudemise aeg ja koht, kuid ka rühmituse järeltuleva põlve arengutingimused on igale piirkonnale spetsiifilised. Seepärast on igal rühmitusel oma areaali piires eelis teiste rühmituste esindajate ees, mis tagab selle järeltulijatele parema võimaluse

ellujäämiseks. Seetõttu jäävad rühmitused püsima, vaatamata nende segunemisele toitumis- ja kudealadel. Teatud parameetrite põhjal (vanuseline koosseis, kasvu iseloom, otoliitide struktuur, migratsioon) on järeldatud, et teatud rühmituse räimede põhiosa ei koe tavaliselt oma peamise kudeala piiridest väljaspool (Grabda, 1980). Suurte lahtede – Botnia, Soome ja Liivi – räimede rõhuv enamus ei lähe välja sünnilahest. Järelikult omavad nimetatud rühmitused enese taastootmise võimet, ehkki need ei ole alati panmiktilised ja vastavad lokaalpopulatsioonidele (Ojaveer, 1988).

Kevadräimel, kes koeb rannale lähemal, on lokaalsete populatsioonide arv suurem kui sügisräimel ning samuti erinevad need populatsioonid ka bioloogiliste tunnuste poolest rohkem kui sügisräimel (Ojaveer, 1988). Keskkonnatingimuste erinevused lokaalpopulatsioonide elutsemise piiridel tingivad ka nende populatsioonide bioloogilised (kasv, toitumine, ränne jm.) ja morfomeetriselised (kehapikkus, silma suurus, otoliidi kuju jm.) erinevused. Üldjoontes, mida kaugemale Taani väinadest, seda selgemini avalduvad räimel kääbuslikud tunnusjooned (Ojaveer, 1988).

Nii kevad- kui sügisräime võib jaotada mere ja lahe populatsioonideks. Mereräim toitub ja talvitub avameres; mõned mereräimede populatsioonid sooritavad pikki rändeid. Laheräim seevastu ei välju tavaliselt kodulahest, ehkki vanemaealised räimed võivad toituda ka avameres. Kõige suuremaks erinevuseks mere- ja laheräime vahel võib lugeda seda, et mereräimed elutsevad palju muutlikumal ja kõrgemal soolsusel (alates 3‰ embrüonaalse ja vastselise arengu piirkonnas kaldatsoonis kuni avamere soolsuseni) kui laheräimed (Ojaveer, 1988). Seoses soolsuse, temperatuurirežiimi ja teiste keskkonnatingimuste erinevustega oma arealis, erinevad mere- ja laheräimede naaberpopulatsioonid üksteisest tunduvalt oma bioloogiliste ja morfomeetriseliste tunnuste, arvukuse dünaamika jt. omaduste poolest. Kuid kudeperioodid mere- ja laheräimel, nii nagu ka sesoonsetel rühmitustel, kattuvad osaliselt ning seepärast nad ka kontaktitsoonis paiknevatel koelmutel teatud määral segunevad (Ojaveer, 1988).

#### 2.4. GENEETILISE STRUKTUURI UURINGUD

Läänemeri on üks suurimaid riimveelisi veekogusid maailmas, tema heterogeenne ökosüsteem on jaotunud mitmetesse alamühikutesse, kus sügavad nõod on osaliselt eraldatud künniste abil. Pinnatemperatuur väheneb loode suunas, soolase vee juurdevool Põhjamerest ning magevee sissevool suurtest jõgedest tekitab tugeva soolusgradiendi (Ojaveer & Elken, 1997). Seetõttu pakub Läänemeri heterogeenset pinnamoodi, kus kalapopulatsioonide

geneetiline struktuur võib olla mõjutatud nii kvalitatiivsetest kui ka kvantitatiivsetest teguritest (Gabrielsen *et al.*, 2002).

Geneetilise mitmekesisuse säilitamine on oluline komponent paljude liikide majandamise planeerimisel. Lõppkokkuvõttes on just geneetiline mitmekesisus see, mis võimaldab liigil kohastuda muutuvate keskkonnatingimustega (O'Connel & Wright, 1997). Et ükskõik millist bioloogilist varu efektiivselt hallata, on vajalik tuvastada geneetilise divergentsi tase nii populatsioonisiselt kui ka erinevate populatsioonide vahel. Aastaid oli põhiliseks strateegiaks kalapopulatsioonide geneetilistel uuringutel allosüümide elektroforees. Ehkki seda meetodit peetakse üldiselt küllaltki informatiivseks (Hauser & Ward, 1998), on see teatud liikide puhul osutunud siiski ebapiisavaks (O'Connel *et al.*, 1998a; Shaw *et al.*, 1999). Tänu DNA-põhiste tehnoloogiate kiirele arengule on võimalik kasutada informatiivsemaid meetodeid (mitokondriaalse DNA analüüs, mikrosatelliitmarkerid). Mitokondriaalse DNA markerite abil on saadud populatsioonide eristamisel olulisi tulemusi näiteks mageveekalade harjuse *Thymallus thymallus* ja hariliku karpkala *Cyprinus carpio* puhul (Gross *et al.*, 2001 ja 2002), samuti näiteks lõhilaste fülogeograafias (Nilsson *et al.*, 2001; Churikov *et al.*, 2001). Mikrosatelliitmarkerite abil on tuvastatud geneetilist mustrit lõhilastel (McConnel *et al.*, 1997; Landry & Bernatchez, 2001), kuid samuti mõnede selliste populatsioonide puhul, kus allosüüm- ja isegi mtDNA markerid on osutunud ebatõhusaks – seejuures on märkimisväärset erinevust märgatud just merekalade puhul (Ruzzante *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 1999). Ka atlandi heeringal on suudetud mikrosatelliitmarkerite abil populatsioone eristada (Shaw *et al.*, 1999; McPherson *et al.*, 2001).

Shaw *et al.* (1999) kasutasid oma uurimuses allosüümide, mtDNA ja mikrosatelliitmarkerite analüüsi, proovides kindlaks teha nii atlandi ja vaikse ookeani heeringa vahelisi geneetilisi erinevusi kui ka atlandi heeringa erinevate populatsioonide olemasolu. Atlandi heeringa proovid koguti Norra vetest (nii fjordidest kui avamerest), Islandi lähistelt ning Barentsi merest. Kasutati *Clupea pallasii* mikrosatelliitlookusi Cpa 17, Cpa 20, Cpa 63, Cpa 113, Cpa 123. Kui allosüümide ja mtDNA analüüsid näitasid, et vaikse ookeani heeringas on kõigist analüüsitud atlandi heeringa proovidest oluliselt diferentseerunud, siis mikrosatelliite kasutades saadi tulemuseks, et vaikse ookeani heeringa ja atlandi heeringa geneetilise erinevuse tase on võrreldav atlandi heeringa erinevate populatsioonide geneetilise erinevuse tasemega – nimelt olid Barentsi merest kogutud proovid oluliselt eristunud lõunapoolsematest piirkondadest kogututest. Shaw *et al.* (1999) usuvad, et nende populatsioonide geneetilise eristuvuse algpõhjuseks võivad olla

topograafilised ja hüdroloogilised faktorid, näiteks erinevused veetemperatuuris Barentsi mere ja lõunapoolsemate piirkondade vahel, samuti fjordidele iseloomulikud karakteristikud, mis võivadki viia erinevalt kohastunud või füüsiliselt isoleeritud populatsioonide tekkeni. Samuti usuvad nad, et populatsioonide geneetilist mitmekesisust võivad põhjustada või säilitada liigi käitumuslikud eripärad, nagu näiteks nii vaikse ookeani kui atlandi heeringa puhul täheldatud tendents, kus täiskasvanud isendid pöörduvad kudemiseks tagasi omaenda sünnialadele (Hourston, 1982; Wheeler & Winters, 1984).

Vastupidiselt aga Shaw *et al.* (1999) saadud tulemustele Barentsi mere heeringa eristumise kohta lõuna poolt, Norra fjordidest ja avamerest kogutud proovidest, leidsid Hauser *et al.* (2001) mtDNA markereid kasutades aga, et olulist erinevust võrreldes ülejäänud proovidega pole ei Barentsi mere heeringal ega Norra fjordiheeringal. Nende uurimuse põhjal selgus, et tugevalt olid eristunud küll Keldi mere ja Läänemere heeringas, samuti islandi suvekudu- ja norra kevadkuduheeringas, kuid Barentsi merest ja Norra vetest kogutud proovide hulgas märkimisväärseid erinevusi ei täheldatud.

Suurtes populatsioonides võib geenitriivi madala taseme tõttu isegi väike selektiivne surve põhjustada geneetilise variatsiooni teket (Guinand *et al.*, 2004). Looduses leidub selliseid suuri populatsioone sageli just merekeskkonnas, mida iseloomustab eelkõige märkimisväärselt vähene barjääride hulk migratsioonile paljude organismide puhul, k.a. kalad. Selektiivse surve all usutakse olevat näiteks *C. pallasi* mikrosatelliitlookus Cpa 112. Larsson *et al.* (2007) võrdlesid allosüüm- ja mikrosatelliitlookusi Põhjamere, Skagerraki väinast ja Läänemerest kogutud atlandi heeringa proovidel. Samu kalu genotüpeeriti nii allosüümide kui mikrosatelliitide uuringu tarbeks. Tulemused näitasid, et allosüümid ja mikrosatelliidid annavad kooskõlalist informatsiooni, v.a. mikrosatelliitlookus Cpa 112, atlandi heeringa ruumilise geneetilise mitmekesisuse suhtes Põhjamere – Läänemere regioonis. Seetõttu usutakse mikrosatelliitlookus Cpa 112 olevat suure selektiivse surve all (Larsson *et al.*, 2007). Võib aga ka olla, et see lookus on nn. pudelikael Läänemeres ning et geenitriiv ja distantsist põhjustatud isolatsioon suurendavad teatud alleelide sagedust. Selliseid võimalikke *outlier*-lookuseid on leitud ka nt. lõhel (Vasemägi *et al.*, 2005) ja tursal (Nielsen *et al.*, 2003).

Laialt tunnustatud seisukoht on, et geneetilise mitmekesisuse vähenemisel on põhjalikud negatiivsed tagajärjed populatsioonide taastumisele ja täienemisele. Siiski on seesuguse bioloogiliselt olulise (st. ajaliselt ja ruumiliselt ilmse) mitmekesisuse olemasolu ja tähtsus rohkearvuliste ja laia levilaga meresäärdekalade puhul tavaliselt vaieldav (McQuinn, 1997). Ruzzante *et al.* (2006) uurimuse eesmärgiks oli uurida heeringa ruumilist jaotumist

Põhjameres ja sellega külgnevatel aladel. Leiti, et eksisteerib selge ja ajaliselt stabiilne geneetiline mitmekesisus kolme suure regiooni heeringate vahel: Põhjameri (sh. Põhjameri põhjaosa, Englise kanal ja Norra meri), Skagerraki väin ning Läänemere lääneosa (sh. Kattegati väin). Neid kolme regionaalset komponenti iseloomustab suhteline homogeensus nende sees ja märkimisväärne heterogeensus nende vahel. Uurimuses leiti veel, et Põhjameri heeringas tungib ka Skagerrakki ning seguneb seal lokaalse ja Läänemere lääneosa heeringaga (Ruzzante *et al.*, 2006). Tulemused viitasid geneetilise mitmekesisuse säilumisele, tingituna ilmselt elukäigust tulenevatest erinevustest nende kolme piirkonna heeringate vahel (kudemisaeg ja -ala, rändemustrid), hoolimata vabast segunemisest suurtel kudemis-, toitumis- ja talvitumisaladel. Fakt, et selline kompleksne liigisisene mitmekesisus säilib, hoolimata kalaparvede segunemisest, näitab tugevat kojupöördumiskäitumist (natal homing) heeringal ka Põhjameres ja sellega külgnevatel aladel (Ruzzante *et al.*, 2006).

Uuringus, kus üheksa mikrosatelliitlookuse abil püüti leida seoseid atlandi heeringa populatsioonistruktuuri ja keskkonna heterogeensus vahel geograafiliselt väikesel, kuid ökoloogiliselt mitmekesisel merealal Põhjamerest kuni Läänemere lääneosani, leiti, et heeringa populatsiooniline struktuur ei ole põhjustatud ainult merealade füüsilisest isolatsioonist (Bekkevold *et al.*, 2005). Oma roll on ka kojupöördumiskäitumisel ja tõenäoliselt kohalikele tingimustele vastavalt diferentseerunud valiku survele. Leiti, et loode-Atlandi (Nova Scotia) ja kirde-Atlandi (Põhjameri) kuderühmitused ei olnud geneetiliselt eristatavad. Rügeni piirkonnas leiti tõendeid reproduktiivse isolatsiooni kohta lühiajalistel, ajaliselt eristunud nn. kudemislainetel (spawning waves) – samal aastal veidi varem kogutud proovides olid isendid geneetiliselt märkimisväärselt erinevad hiljem kogutud proovides leidunud isenditest (Bekkevold *et al.*, 2005). Samuti leiti märke kaugusest põhjustatud isolatsiooni kohta, kuid ühtlasi ka, et nii minimaalne kui ka keskmine merevee soolsus ilmutas tugevat korrelatsiooni populatsioonide geneetilise diferentseeritusega. Märkimisväärne korrelatsioon vee soolsuse ja kudekalade geneetilise mitmekesisuse vahel näitas, et soolsuse parameetrid ja/või sellega seotud faktorid olid vastavuses geenisiirdega kudealade vahel, viidates, et pigem soolsuse erinevused kui kaugus iseenesest mõjutasid reproduktiivse isolatsiooni ulatust kuderühmituste hulgas (Bekkevold *et al.*, 2005). Lokaalset adaptatsiooni spetsiifilisele soolsusrežiimile nimetatud analüüs ei näidanud, kuid pakkus võimalust võrrelda geneetilisi ning erinevaid keskkonnaparametreid, hindamaks nende koostoime suhtelist ulatust. Suurim reproduktiivne isolatsioon (suurim erinevus geenisiirdes) ilmnes selles uurimuses Skagerraki ja Kattegati kudealade vahel. Piirjoon nende vahel vastab peamisele üleminekutsoonile soolsusparameetrites ja üldisele suundumusele stabiilsema

keskkonna suunas piirjoonest loodes, millele vastupidiselt on piirjoonest kagus rohkem muutlikud keskkonnatingimused (Bekkevold *et al.*, 2005). Piki Põhjamere – Läänemere üleminekutsooni viitavad ruumiliselt muutlikud, kuid lokaalselt stabiilsed keskkonnatingimused, et erinevate kudealade heeringa puhul toimub stabiliseeriv seleksioon erinevatele soolsustolerantsi optimumidele. Urvides geneetilise muutlikkuse erinevusi ruumilisel skaalal, hindasid Bekkevold *et al.* (2005) ka alleelirohkust ning leidsid, et muutlikkus kahaneb Põhjamere Läänemere poole. Samasuguseid tulemusi on leitud tursa *Gadus morhua* (Nielsen *et al.*, 2003) ja kammelja *Scophthalmus maximus* puhul (Nielsen *et al.*, 2004), samuti sama piirkonna meretaime *Zostera marina* puhul (Olsen *et al.*, 2004). Sellised mustrid vastavad teooriale asutajaefektist, mille põhjal heeringa kolonisatsioon toimus Põhjamere üle Skagerraki umbes 9000 aastat tagasi, kui Läänemeri oli vabanenud jääst.

Seleksioon soolsuse tõttu kui oluline mõjur heeringa populatsioonistruktuuri kujunemisel tuleb välja ka Gaggiotti *et al.* (2009) uurimusest. Teine olulisem tegur on toitumisränded – iga-aastased migratsioonid populatsioonidele individuaalsetelt kudealadelt ühistele toitumisaladele – mille tõttu tekib toitumisaladel erinevatest lähtepunktidest pärinevate kalade segunemine, mis tõenäoliselt hõlbustab geenisiiret kudepopulatsioonide vahel (Ruzzante *et al.*, 2006). Gaggiotti *et al.* (2009) hindasid ka loodusliku valiku ning keskkonnafaktorite rolli atlandi heeringa geneetilise struktuuri kujunemisele Põhjameres ja Läänemeres ning leidsid, et veetemperatuur erilist rolli ei mängi, kuid soolsus võib mõjuda ühe kindla lookuse – Cpa 112 – struktureerumisele. Seega leiti tõenäoline korrelatsioon lookuse Cpa 112 ja vee soolsuse vahel: kui see lookus oli analüüsi kaasatud, oli soolsuse mõju populatsiooni geneetilisele struktuurile tugev; kui lookus Cpa 112 aga analüüsist välja jäeti, ei leitud ka soolsusel olulist mõju struktuurile olevat. Nende leidudega kinnitati ka Larsson *et al.* (2007) seisukohti. Kinnitust leiti ka arvamusele, et populatsioonispetsiifilisel rändekäitumisel on oluline mõju populatsioonistruktuurile.

Populatsioonid, mis asustavad kõrge (Põhjameri) või madala (Läänemeri) soolsusega alasid, on geneetiliselt hästi ühendatud, samas kui populatsioonid, mis asustavad keskmise soolsusega alasid (Taani väinad) on geneetiliselt isoleeritud (Gaggiotti *et al.*, 2009). See viitab asjaolule, et geenisiire neist populatsioonidest, mis asustavad kas kõrge või madala soolsusega alasid neisse populatsioonidesse, mis asustavad keskmise soolsusega alasid, on harv ja et geenisiire toimub pigem nende populatsioonide vahel, kes elutsevad sarnastes soolsustingimustes. Gaggiotti *et al.* (2009) leidsid ka, et populatsioonide geneetiline isolatsioon suureneb seoses rändedistantsi suurenemisega, mis näitab, et laiaulatuslikud

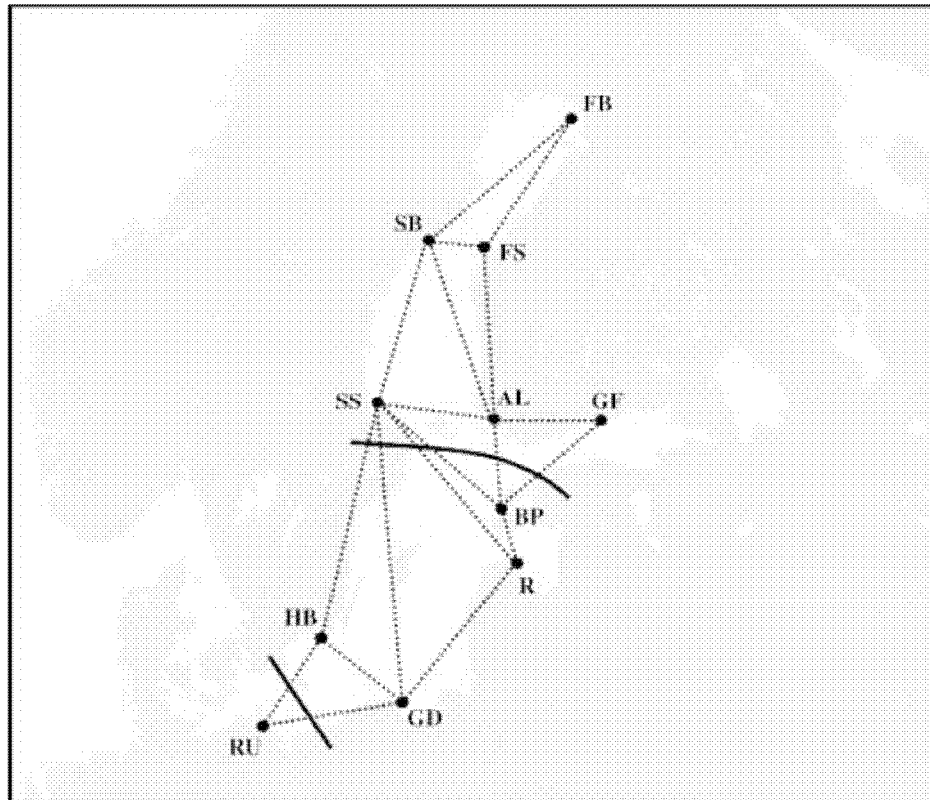
migratsioonid ei vii tingimata geenisiirdeni. Seega usutakse, et pelaagiliste merekalaliikide geneetilise mitmekesisuse struktuuri mõjutavad nii keskkonnafaktorid, käitumuslikud ja füsioloogilised tunnused kui ka demograafiline ajalugu.

Tursa *Gadus morhua* ja kammelja *Scophthalmus maximus* puhul on leitud madalat geneetilist mitmekesisust vastavalt Põhjameres ja Läänemeres, kuid järsku geneetilise diferentseerituse suurenemist üleminekualadel nende kahe piirkonna vahel (Nielsen *et al.*, 2003 ja 2004). Seda üleminekuala iseloomustab järsk soolsuse suurenemine Läänemere poolt Põhjamerre suunas. Uurimistulemused näitavad mõlema mainitud liigi puhul hübriidsoonide olemasolu, mis on ilmselt säilinud tänu looduslikule valikule. Usutakse, et on võimalik, et ka atlandi heeringal on samas geograafilises regioonis hübriidsoon (Jørgensen *et al.*, 2005). Hübriidsooni olemasolu ei kinnitanud aga Bekkevoldi *et al.* (2005) uurimus, kuna nende hinnagul toimub valik pigem hübriidide tekke vastu.

Jørgensen *et al.* (2005) uurimuses keskenduti eelkõige küsimustele, kas geograafiline kaugus (isolatsioon distant si töttu), kvantitatiivsed (soolsus ja temperatuur kudemisajal) ja kvalitatiivsed karakteristikud (Läänemere struktuur – keerised ja nõod) üksikult või ühendatuna võivad põhjustada või säilitada geneetilist mitmekesisust erinevate räimerühmituste vahel. Leiti, et korrelatsioon kudealade geograafilise ja kalade geneetilise distant si vahel ei olnud märkimisväärne, mistõttu järeldati, et distant sist tingitud isolatsiooni kudeparvede vahel ei esine. Samas oli korrelatsioon geneetilise ja keskkonnast tingitud distant si vahel (erinevused soolsuses ja temperatuuris proovide kogumiskohtades) märkimisväärne kõigis testides. Suurim eristumine tuli ilmsiks Rügeni heeringa puhul. Kogutud materjali lõikes leiti kolm ala suhteliselt järskude erinevustega geneetilises ülesehituses (joonis 2). Esimene barjäär (toetatud 5 lookuse poolt) eraldas ühe Rügeni proovi kõigist ülejäänud proovidest. Teine barjäär (toetatud 5-9 lookuse poolt barjääri eri osade lõikes) eraldas ülejäänud Rügeni proovid kõigist teistest proovidest. Kolmas barjäär (toetatud 4-6 lookuse poolt) eraldas lõuna- ja keskosa proovid (Gdanski laht, Hanö laht, Liivi laht ja avameri) kaugemalt põhja poolt (k.a. suurtest lahtedest) kogutud proovidest; lahtedest, millel on oma tsirkulatsioonisüsteemid ja keskkonnarežiim soolsuse ja temperatuuri suhtes ja mis on avamerest eraldatud künniste abil (Soome laht, Ahvenamaa saarestik, Botnia laht, Botnia meri). Jørgensen *et al.* (2005) uurimusest tuleb välja, et madalama geenisiirdega tsoonides avaldus populatsioonide gruppidel kõrgem geneetiline mitmekesisus gruppide vahel kui grupisiseselt, ehkki samas ka grupisisesed populatsioonid ei moodustanud panmiktilisi ühikuid. Seetõttu on need tulemused kooskõlas varasemate töödega (Shaw *et al.*, 1999; McPherson *et al.*, 2004), kus tuvastati väga madal, kuid siiski statistiliselt oluline

diferentseerumine avamere kudekarjade vahel. Nende tulemuste tõlgendamine võib aga osutada komplitseeritaks. Oluline on, et samades paikades leiti ajalist geneetilist diferentseerumist, ehkki enamikus proovivõtupaikades eeldati populatsioonide geneetilise struktuuri ajalist stabiilsust. Ajaliselt erinevat geneetilist muutlikkust leiti Rügeni saare ja Ahvenamaa saarestiku proovikogumispaikades (Jørgensen *et al.*, 2005). See leid omistati erinevatele kudemislainetele – need on geneetiliselt diferentseerunud kuderühmitused, mis koevad samal alal, kuid erinevatel aegadel (küll mõningase ajalise kattuvusega). Erinevate kudemislainete esinemist atlandi heeringa puhul on oletatud ka morfoloogiliste tunnuste, kasvumäära ja parasiitide põhjal (Lambert, 1987; Podolska & Horbowy, 2002). Kudemislainete esinemine raskendab oluliselt heeringa geneetilise mitmekesisuse tõlgendamist. Näiteks võib erinevate kudemislainete analüüs erinevatel aastatel viia ekslike järeldusteni efektiivse populatsioonisuuruse prognoosimisel. Teise olulise tulemuse põhjal väidavad Jørgensen *et al.* (2005), et geneetiline mitmekesisus pole korrelatsioonis geograafiliste kaugustega populatsioonide vahel. Samas aga on geneetiline diferentseerumine märkimisväärses korrelatsioonis vee soolsuse ja temperatuuri erinevustega, kuid see seos peegeldab eelkõige geneetilist mitmekesisust Rügeni proovides Läänemere edelaosas, kus soolsuse ja temperatuuri gradiendid on kõige järsemad. Sama on täheldatud ka varasemates uurimustes (McPherson *et al.*, 2004). Siiski tõestab selline seos, et keskkonna erinevustel on räämepopulatsioonide geneetilisele mitmekesisusele suurem mõju kui lihtsalt geograafilisel kaugusel (Jørgensen *et al.*, 2005). Kolmas selle uurimuse oluline tulemus on kahe geograafilise tsooni tuvastamine, mis ilmselt toimivad barjääradena geenisiirdele. Need tsoonid vastasid 1) üleminekutsoonile Läänemere edelaosas ja 2) Läänemere põhjaosa ja keskmiste osade jagunemisele erinevateks nõgudeks (Jørgensen *et al.*, 2005).



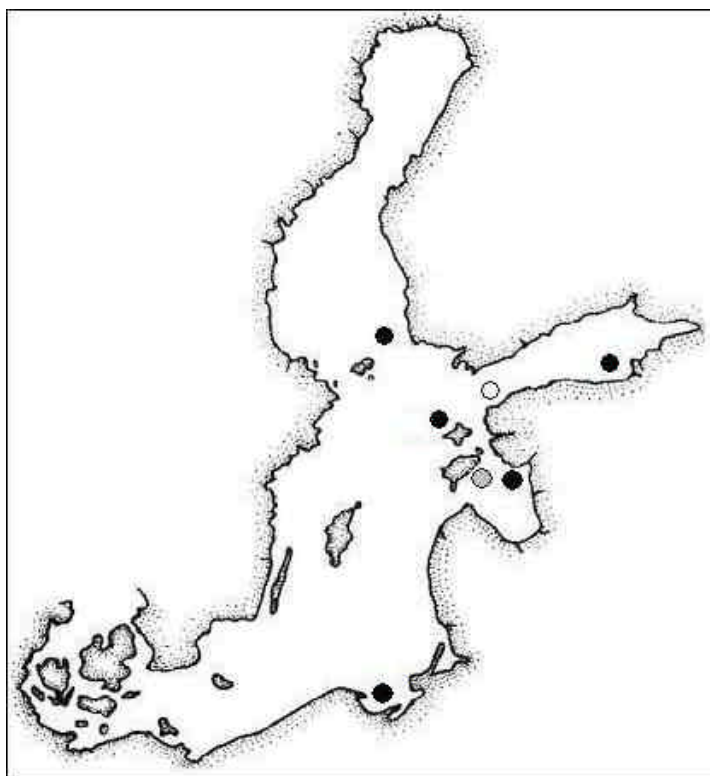


**Joonis 2.** Limiteeritud geenisiirde piirkonnad Läänemeres Jørgensen *et al.* (2005) põhjal. Tumedad jooned tähistavad peamisi oletatavaid barjääre geenisiirdele erinevate räimerühmituste vahel.

### 3. MATERJAL JA METOODIKA

#### 3.1. MATERJAL

Kokku koguti 850 räime koeproovi, mis pärinesid Läänemere seitsmest erinevast piirkonnast ajavahemikul juuni 2002 – september 2003 töönduspüükide käigus püütud kaladelt (tabel 1). Kõik kalad saadi kaluritelt; püügipiirkonnad olid järgmised: Narva laht, Pärnu laht, Luidja laht (Hiiumaa loodeosa), Keibu laht (Soome lahe suue), Veiserahu (Saaremaa kaguosa), Gdanski laht, Botnia meri. 750 koeproovi kogus töö autor (kõik Eesti vete proovid), 50 proovi saadi Soomest pr Sara Källilt ja 50 proovi Poolast dr. Mirosław Wyszynskilt. Analüüsil kasutati kokku 300 Läänemere kuuest erinevast piirkonnast püütud räime koeproovi, igast piirkonnast 50 (joonis 3). Kevadräime geneetilisteks uuringuteks koguti materjal aastatel 2002 ja 2003 neljast piirkonnast Eesti vetes – Narva lahest, Pärnu lahest, Soome lahe suudmest (Keibu laht) ja Läänemere avaosast Hiiumaa lähistelt (Luidja laht). Samuti olid uuringusse kaasatud kolleegidelt Soomest (Botnia meri) ja Poolast (Gdanski laht) saadud proovid.



**Joonis 3.** Materjali kogumise kohad. Mustad punktid – analüüsis kasutatud kevadräime püügikohad; hall punkt – sügisräime püügikoht; valge punkt – kogutud, kuid analüüsist välja jäetud kevadräime püügikoht.

Võrdlusmaterjalina koguti 100 isendi koeproovid sügisräime geneetilisteks uuringuteks 2003. aastal Veiserahult Saaremaa lähistelt, kust on teada üks põhilisi sügisräime populatsioone (Ojaveer, 1995) (tabel 1).

Kõik kalad on püütud kudeaegadel (olenevalt piirkonnast märtsist septembrini) ning kudealadelt.

Avamere 2002. aasta, Narva lahe 2003. aasta, Botnia mere ning Gdanski lahe räimed olid püütud põhjatraaliga (silmasuurus 18-24 mm), kõik ülejäänud proovid seisevnoodaga (silmasuurus 14-18 mm). Püügikohtade veesügavus varieerus 5-10 meetrini seisevnoodaga püütud kohtades ning 25-35 meetrini traalpüügi puhul. Püügi kestvus seisevnooda puhul 1-7 ööpäeva, traali puhul 4-6 tundi.

**Tabel 1.** Andmed kogutud materjali kohta.

piirkond	püügiaeg	kogutud isendite arv	isendite arv, kellelt on eraldatud DNA	geneetilise analüüsi läinud isendite arv
Narva laht	31.05.2002	100	20	0
Narva laht	27.05.2003	100	50	50
Pärnu laht	18.06.2002	100	8 (DNA lagunenu)	0
Pärnu laht	17.06.2003	100	50	50
avameri (Hiiumaa loodeosa)	09.06.2002	50	20	0
avameri (Hiiumaa loodeosa)	04.06.2003	100	50	50
Soome lahe suue	18.06.2002	100	50	0
Botnia meri	08.05.2003	50	50	50
Gdanski laht	11.03.2003	50	50	50
sügisräim (Saaremaa kaguosa)	04.09.2003	100	50	50

DNA analüüsiks lõigati kala lihaskoest (lõpusest) 100-200 mg suurune tükk, mis säilitati 96% etanoolis temperatuuril -20°C; kõik koeproovid asuvad Tartu Ülikooli zooloogia õppetooli geenipangas Vanemuise 46, Tartu. Kõigil kogutud räimedel mõõdeti üldpikkus,

kaal (üldmass; kasutati laborikaalu Sartorius 600, täpsusega  $\pm 0,1g$ ), määrati silmaga vaadeldes sugu ja gonaadide küpsusaste (I-VI; ICES 2009) ning võeti otoliit kala vanuse määramiseks.

Geneetiliseks analüüsiks kasutati vaid osa proovidest, mis prognoositavalt peaksid andma usaldusväärse ülevaate räime geneetilisest mitmekesisusest uuritud alade lõikes:

#### 1. Kevadräim

- Narva lahe 2003. aasta proovid (tähis N)
- Pärnu lahe 2003. aasta proovid (tähis P)
- avamere 2003. aasta proovid (tähis A)
- Botnia lahe proovid (tähis B)
- Gdanski lahe proovid (tähis G)

#### 2. Sügüsräim

- kõik proovid (tähis Sr)

### 3.2. GENOOMSE DNA ERALDAMINE

DNA eraldati ~25 mg suurusest külmutatud koetükist. Eraldamiseks kasutati High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics) vastavalt tootja juhiste, st. igale koetükile lisati 200 $\mu$ l kude lüüsiivat puhvrit (Tissue Lysis Buffer) ning 40 $\mu$ l proteinaas K-d. Proove inkubeeriti 55°C juures aeg-ajalt vorteksil segades kuni koemassi täieliku lüüsumiseni. Seejärel lisati 200 $\mu$ l siduvat puhvrit (Binding Buffer), segati vorteksiga 15 sekundit ning inkubeeriti 70°C juures 10 minutit. Seejärel lisati nukleiinhappe sadestamiseks 100 $\mu$ l isopropanooli ning segati vorteksiga 15 sekundit. Kogu mikstuur (k.a. sade) asetati kombineeritud (filtertuub+kollektsioonituub) High Pure kolonnile ning tsentrifugeeriti 8000 rpm 1 minut. Kurnatis visati minema ja filtertuub asetati puhtasse kollektsioonituubi. Filtertuubi lisati 500 $\mu$ l inhibiitorit eemaldavat puhvrit (Inhibitor Removal Buffer) ning tsentrifugeeriti 8000 rpm 1 minut. Filtertuub pandi puhtasse kollektsioonituubi, kurnatis visati ära. Filtertuubi lisati 500 $\mu$ l pesevat puhvrit (Wash Buffer) ning tsentrifugeeriti 8000 rpm 1 minut. Filtertuub asetati puhtasse kollektsioonituubi, kurnatis visati ära. Protseduuri peseva puhvriga korrati – lisati filtertuubi 500 $\mu$ l puhvrit ning tsentrifugeeriti 8000 rpm 1 minut. Kurnatis visati minema, filtertuub asetati samasse kollektsioonituubi ning tsentrifugeeriti puhvrijäägi eemaldamiseks 14000 rpm 10 sekundit. Kollektsioonituub koos kurnatisega visati minema; filtertuub asetati puhtasse 1,5ml tuubi. Filtertuubi lisati 200 $\mu$ l eelsoojendatud 70°C eluatsioonipuhvrit (Elution Buffer) ning tsentrifugeeriti 8000 rpm 1 minut.

Saadud DNA-d hoiti kahes jaos, väiksemat kogust (50µl) kohesteks edasisteks analüüsideks temperatuuril -20°C, ülejäänud osa (150µl) viidi geenipanka temperatuurile -80°C.

### 3.3. MIKROSATELLIITIDE ANALÜÜS

Geneetiline analüüs teostati mikrosatelliitmarkerite abil. Mikrosatelliidid on kõrge varieeruvusega, mittekodeerivad, lühikesed, tandemitena esinevad kordusjärjestused tuuma-DNAs. Korduste arvu varieeruvuse põhjuseks on ahela libisemisest tekkinud vead DNA replikatsioonil, mille tulemusena on paljude mikrosatelliidi lookuste suhtes enamuse isendeid populatsioonis heterosügootsed. Polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) abil saab amplifitseerida neid DNA piirkondi, mis selliseid järjestusi sisaldavad, kusjuures PCRi produkti pikkuse määrab korduste arv (Ashley, 1999). Mikrosatelliidid on valikuliselt neutraalsed, polümorfsed ja päranduvad kodominantselt; nende suur varieeruvus teeb nad äärmiselt informatiivseteks ühe liigi indiviidide sugulusastme määramiseks ning populatsiooni geneetilise struktuuri iseloomustamiseks (Hansen *et al.*, 2001). Praimerid PCRi jaoks disainitakse komplementaarsed mikrosatelliidi kordusjärjestusele külgnivate aladega (järjestustega) (Ashley, 1999).

Mikrosatelliitide amplifikatsiooniks kasutati PCR-meetodit, kus iga lookuse jaoks oli kaks praimerit – üks fluoromärkega ja teine ilma. Analüüsiks kasutati seitset erinevat *Clupea pallasi* jaoks eelnevalt iseloomustatud dinukleotiidsed mikrosatelliitlookust – Cpa 125, Cpa 134, Cpa 63, Cpa 34, Cpa 123, Cpa 104, Cpa 20 (O’Connell *et al.*, 1998b; Miller *et al.*, 2001; Olsen *et al.*, 2002), mis väidetavalt töötavad ka *C. pallasi*’le lähedastel liikidel ja alamliikidel nagu *C. harengus membras* (O’Connell *et al.*, 1998b).

Mikrosatelliitlookuste PCR-reaktsioonid viidi läbi 10µl-s: 1U Amplitaq Gold DNA polümeraasi (Applied Biosystems), 1µl 10-kordset kontsentreeritud PCR puhvrit (Applied Biosystems), 2mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems), 0,2mM dNTP (Fermentas), 4 pmol praimerite segu (fluoropraimerid firmalt Applied Biosystems, märketa praimerid firmalt DNA Technology) ja 10 – 50 ng puhastatud DNAd.

PCR viidi läbi järgmistel tingimustel: 95°C 15 minutit, seejärel 38 tsüklit 95°C 30 sekundit, 55°C 30 sekundit, 72°C 30 sekundit; lõpuks 72°C 7 minutit. PCRi produktid visualiseeriti elektroforeesil 1,5% agarosgeelis 1×TBE-s (tris-boraat-etüleendiamiintetraatsetaat) pH 8,3.

Et lahutada PCRi produkte kapillaarelektroforeesil, tuli puhastada PCRi segu peale reaktsiooni toimumist sooladest, milleks prooviti kahte meetodit – puhastamist dialüüsil ja Sephadex G-50 geelfiltratsioonil. Kui enamiku geneetiliste analüüside läbiviimine toimus Tartu Ülikooli zooloogia laboratooriumis, siis puhastatud PCRi produkte analüüsiti MegaBace 1000 kapillaarautomaatsekvenaatoril (Amersham Pharmacia Biotech) koostöös Eesti Biokeskusega.

Produkti puhastamiseks dialüüsil kasutati dialüüsiplaati (Multiscreen VM, Clear Plates, Cat no MAVMN0550, Millipore) ning dialüüsilahust 10mM Tris pH 8; 0,1 mM EDTA pH 8 (2 liitrile milliQ veele lisati 2ml 1M Tris pH 8 ja 0,4ml 0,5M EDTA'd pH 8). PCRi produktile lisati vett kuni 20 $\mu$ l-ni. Tühi dialüüsiplaat (alumine plastikkate eemaldatud) asetati 2 liitrise dialüüsilahusesse pre-dialüüsiks (15-30 minutit). Pärast seda asetati dialüüsiplaat eemaldatud plastikkattele. PCRi produkt + vesi kanti dialüüsiplaadile. Dialüüsiplaat asetati magnetsegajale dialüüsilahusesse 30 minutiks, seejuures lahust kergelt segades, et plaat aeglaselt keerleks. Valmistati ette ET-400R segu (molekulmassi standardmarker): 96 proovi puhul lisati 25 $\mu$ l-le ET-400R-le 475 $\mu$ l 0,1% Tween 20; segati vorteksiga. Kannudesse lisati 10 $\mu$ l geelfiltratsioonil puhastatud PCRi produkti ja 0,25 $\mu$ l vastavat molekulmassi markerit. Vabaks jäänud kannud täideti 10 $\mu$ l veega. Plaat kaeti tihedalt parafilmiga ja tähistati, proovidest valmistati nimekiri. Plaat koos nimekirjaga viidi Eesti Biokeskusesse MegaBace analüüsile; kuni analüüsi läbiviimiseni hoiti plaati temperatuuril -20°C.

PCRi produkti puhastamiseks Sephadex G-50 filtratsioonil valmistati kõigepealt ette geelfiltratsiooniplaat: võeti Sephadex G-50 (Fine, Pharmacia) ja kanti see maatriksplaadile, vedades puru väikese plaadi abil ühtlaselt laiali; ülejääk pühiti geelitopsi tagasi. Maatriksplaadile asetati peale filtreerimiseks ettenähtud plaat (Multiscreen HV Clear Plates, Cat no MAHVN4510, Millipore) ja keerati plaadid teistpidi, nii et puru läheks maatriksplaadilt filtratsiooniplaadile. Geelipurule lisati 350 $\mu$ l milliQ vett. Plaat koos geelikomponentidega jäeti 5 tunniks toatemperatuurile punduma. Pärast seda fuugiti geel kuivaks Hettichi tsentrifuugis selleks ettenähtud rootoris (1612) 6 minutit 900g (2630 rpm), 25°C. PCR-i produktile lisati vett kuni 20 $\mu$ l-ni ning kanti see filtreerimisplaadi keskele. Filtreerimisplaat asetati tavalisele 96-augulisele plaadile nii, et augud jääksid kohakuti; asend fikseeriti kleeplindiga. Plaat fuugiti 6 minutit 900g (2630 rpm), 25°C juures. ET-400R segu valmistati ette nagu eelpool dialüüsi puhul. Sorensoni 96 auguga plaadile (Cat no 28110) pipeteeriti igasse kannu 10 $\mu$ l geelfiltratsioonil puhastatud PCRi produkti ja 0,25 $\mu$ l vastavat molekulmassi markerit ET-400R. Vabaks jäänud kannud täideti 10 $\mu$ l veega. Plaat kaeti

parafilmiga ja tähistati, proovidest valmistati nimekiri. Plaat koos nimekirjaga viidi Eesti Biokeskusesse MegaBace analüüsile; kuni analüüsi läbiviimiseni hoiti plaati temperatuuril -20°C.

### 3.4. POPULATSIOONISTRUKTUURI JA GENEETILISE MITMEKESISUSE ANALÜÜS

Lähtudes erinevate lookuste varieeruvusest, koostati igale analüüsitud isendile nn geneetiline pass. Selleks kasutati programmi MegaBace Genetic Profiler v1.1 (Amersham Pharmacia Biotech). Geneetiline pass vastab kõigi analüüsitud mikrosatelliitide lookuste pikkusmuustrile, st. iga isendi jaoks saadi iga lookuse kohta kindla pikkusega alleelid (vt. lisa 1). Programmi poolt tuvastatud alleelide pikkused kontrolliti üle, leitud vead parandati. Programmi Structure v2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000) abil leiti eeldatavate populatsioonide arv (K) ning vaadeldi indiviidide jaotumist arvatavatesse populatsioonidesse. Populatsioonide arvu testiti vahemikus K1 - K10, igäihe puhul tehti 5 MCMC kordust iteratsioonide arvuga  $7 \times 10^5$ , millest jäeti välja nn. tõusufaas (burn-in), mis koosnes  $7 \times 10^4$  iteratsioonist. Esmalt kasutati seadistust Usepopinfo, mille väärtuseks võeti 0 (muud informatsiooni populatsioonide kohta ei lisatud) ning seejärel kasutati admixture-mudelit. Kõige tõenäolisema populatsioonide arvu määramiseks kasutati andmestiku apriorset tõenäosust  $[\ln P(D)]$ , nagu on välja pakkunud Evanno *et al.* (2005). Populatsiooni geneetilise mitmekesisuse parameetrite arvutamiseks kasutati programmi GenAlEx v6 (Peakall & Smouse, 2005). Selle abil hinnati oletatavat ( $H_E$ ) (Nei, 1987) ja leitud ( $H_O$ ) (Hedrick, 1983) heterosügootsust, alleelide arvu ( $N_A$ ) ning arvutati  $F_{ST}$  statistiku (Weir & Cockerham, 1984) väärtus iga lookuse ja populatsiooni puhul. Võimalikke kõrvalekaldeid Hardy-Weinbergi (HW) tasakaalust kontrolliti programmiga GenePop (Raymond & Rousset, 1995), mille abil määrati Fisheri meetodit kasutades HW tasakaal üle kõigi lookuste ja populatsioonide. Lisaks kasutati Paetkau *et al.* (1995) poolt loodud mikrosatelliitide alleelisagedustel põhinevat populatsioonide hindamise testi, mis teostati Doh *assignment test*'i abil (<http://www2.biology.ualberta.ca/jbrzusto/Doh.php>).

## 4. TULEMUSED

### 4.1. GENOOMSE DNA ERALDAMINE

Koeproovid koguti kokku 850 räimel; DNA eraldati 398 räimel, kellest 8 oli DNA lagunenu. Edaspidisteks analüüsideks kasutati 300 räime DNA-d (tabel 1).

### 4.2. MIKROSATELLIITIDE ANALÜÜS

PCRi produkti puhastamiseks sooladest prooviti kahte meetodit – puhastamist dialüüsil ja Sephadex G-50 geelfiltratsioonil. Kuna dialüüsil puhastamine andis eelkatsetel ebauhtlasemaid tulemusi, puhastati kõigilt käesolevas töös analüüsitud isenditelt saadud materjal Sephadex'i geelfiltratsioonil.

Mikrosatelliitide analüüsiks kasutati algselt seitset erinevat *Clupea pallasii* lookust. Üks lookustest, Cpa 134, ei andnud korrektseid tulemusi ning jäeti andmetööst välja. Samuti kõrvaldati lookus Cpa 34, mille kohta saadud tulemused ei olnud usaldusväärsed – väidetava alleeli pikkusmuster ei olnud kooskõlas programmi juhendis toodud mustripildiga (vt. lisa 3). Parimad tulemused saadi lookustega Cpa 104, Cpa 63 ja Cpa 20; seejuures olid kaks esimest parimad andmete selguse ja tõepärasuse osas, kaks viimast aga puuduvate andmete suhtelise vähesuse (10%) tõttu.

Kuna alleelide pikkuste hindamisel ei õnnestunud kõigi kalade kohta saada täisandmeid viie analüüsi jäänud mikrosatelliitlookuse kohta, siis jäeti edasisest analüüsist välja need isendid, kellel oli andmeid puudu rohkem kui ühe lookuse kohta. Grupist P (Pärnu laht) jäeti välja 4 isendit (proovid tähistusega P26, P31, P41 ja P43); grupist N (Narva laht) 9 isendit (proovid tähistusega N3, N9, N10, N13, N25, N33, N34, N40 ja N41); grupist Sr (sügisräim) 5 isendit (proovid tähistusega Sr13, Sr17, Sr18, Sr21 ja Sr31); grupist G (Gdanski laht) 10 isendit (proovid tähistusega G4, G18, G19, G23, G28, G35, G36, G38, G41 ja G49); grupist A (avameri) 8 isendit (proovid tähistusega A1, A7, A9, A18, A20, A23, A35 ja A37) ja grupist B (Botnia meri) samuti 8 isendit (proovid tähistusega B3, B5, B7, B9, B11, B17, B27 ja B40). Kokku jäi lõppanalüüsidesse 256 isendit.

Kõik viis mikrosatelliitlookust olid kõrge polümorfisusega kõigis gruppides, heterosügootsuse määr oli  $H_E = 0,830 - 0,972$ ;  $H_O = 0,715 - 0,849$ . Alleelide arv lookuse kohta oli samuti kõrge (19 – 88). Keskmiseks alleelide arvaks lookuse kohta saadi 56,



seejuures kõige suurem kõrvalekalle keskmisest leiti lookustel Cpa 125 (88 alleeli) ja Cpa 63 (19 alleeli) (tabel 2).

**Tabel 2.** Andmed populatsiooni parameetrite kohta, populatsioonide arv  $K = 1$ .  $N$  – analüüsitud isendite arv lookuse kohta;  $N_A$  – alleelide arv;  $H_O$  – leitud heterosügootsus;  $H_E$  – oletatav heterosügootsus.

populatsioon	lookus	N	$N_A$	$H_O$	$H_E$
A	Cpa 125	238	88	0,849	0,972
	Cpa 63	239	19	0,720	0,848
	Cpa 123	228	60	0,820	0,958
	Cpa 104	221	56	0,715	0,830
	Cpa 20	239	57	0,749	0,948

Andmetöötlusprogramm Structure leidis kõige tõenäolisemaks populatsioonide arvuks käesolevas töös kasutatud materjali põhjal 1 ( $K = 1$ ). Oluliselt väiksema tõenäosusega pakkus programm võimalust, et tegemist võib olla kahe populatsiooniga ( $K = 2$ ; vt. lisa 2); admixture analüüs näitas, et need kaks hüpoteetilist populatsiooni ei eristunud geograafilise asukoha põhisedelt (tabel 3 ja joonised 4 ja 5). Kontrollimaks hüpoteesi analüüsitud isendite jagunemisest kahte populatsiooni, kasutati alleelide sagedustel põhinevat Doh *assignment test*'i (tabel 4). Tabelist nähtub, et Structure' ja Doh *assignment test*'i tulemuste kokkulangevuse protsent on ~68 – see on kalade protsent, kelle jagunemist kahte gruppi peavad võimalikuks mõlemad testid. Programm GenePop näitas kõrvalekallet Hardy-Weinbergi tasakaalust üle kõigi analüüsitud isendite.  $F_{ST}$  statistiku väärtuseks saadi 0,01304.



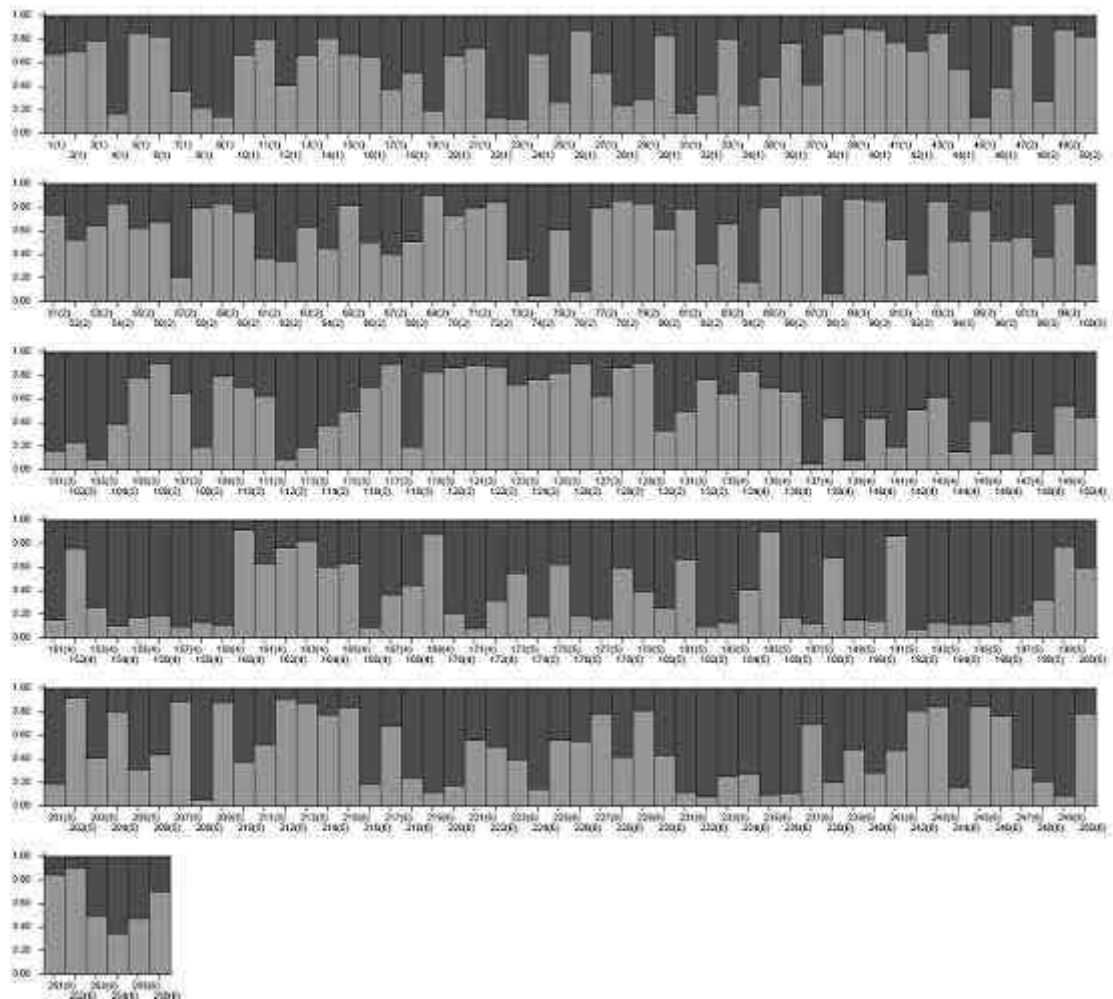
**Joonis 4.** Analüüsitud isendite jagunemine kaheks hüpoteetiliseks populatsiooniks programmi Structure põhjal. Tumedam ala – isendi tõenäoline kuuluvus hüpoteetilisse populatsiooni A; heledam ala – isendi tõenäoline kuuluvus hüpoteetilisse populatsiooni B.

**Tabel 3.** Analüüsitud isendite jagunemine kahte hüpoteetilisse populatsiooni programmi Structure järgi. Teises ja kolmandas tulpas on näha vastavasse populatsiooni kuulumise tõenäosuse arvvaartus (max 1,0).

Analüüsitud grupp	Oletatav populatsioon	Oletatav populatsioon	Indiviidide arv
	1	2	
P:	0,454	0,546	46
N:	0,375	0,625	41
Sr:	0,411	0,589	45
G:	0,598	0,402	40
A:	0,568	0,432	42
B:	0,545	0,455	42

**Tabel 4.** Structure ja Doh testide kokkulangevus. Sampled in – proovide arv, mis programmi Structure hinnangul jaguneb kahte erinevasse populatsiooni; Assigned to – proovide arv, mis programmi Doh poolt määrati kahte erinevasse populatsiooni.

Sampled in (Structure)	Assigned to (Doh)	
	1	2
1	127	11
2	69	47



**Joonis 5.** Analüüsitud isendite jagunemine kaheks hüpoteetiliseks populatsiooniks programmi Structure põhjal. Tumedamad ja heledamad alad näitavad kuuluvuse tõenäosust populatsiooni A või B iga isendi kaupa eraldi. Sulgudes on toodud analüüsitud grupid: 1 – grupp P; 2 – grupp N; 3 – grupp Sr; 4 – grupp G; 5 – grupp A; 6 – grupp B.

## 5. ARUTELU

Algselt prooviti analüüsiks kasutada seitset mikrosatelliitlookust. Ühega neist (Cpa 134) ei õnnestunud saada korrektseid tulemusi, teise (Cpa 34) puhul aga olid tulemused ebausaldusväärsed. Kuna võrreldavates uuringutes neid lookusi kasutatud ei ole, ei saa kahjuks kõrvutada nende konkreetsete lookuste informatiivsust varasemate tööde tulemustega. Kuna ülejäänud viis lookust andsid selgelt interpreteeritavaid tulemusi, leiti käesolevas töös ka kinnitust varasemates uuringutes mainitud asjaolule, et *Clupea pallasii*'le disainitud primereid on võimalik kasutada geneetiliselt lähedasel *C. harengus*'el (Shaw *et al.*, 1999; Jørgensen *et al.*, 2005; Larsson *et al.*, 2007; Gaggiotti *et al.*, 2009). Erinevalt näiteks Shaw *et al.* (1999) uurimusest saadi käesolevas töös usaldusväärsed tulemused ka lookuse Cpa 123 kohta, mis viidatud uurijatel osutus analüüsiks kõlbatuks.

Vaadeldes alleelide pikkuseid lookuste kaupa, tuvastati igal analüüsitud isendil homo- või heterosügootsus eraldi iga lookuse kohta. Selgus, et osa programmi poolt pakutud andmetest ei olnud tõesed – väidetava alleeli esinemise tõenäosus oli juba programmi poolt eeldatult madal või ei vastanud pikkusmuster programmi juhendis toodud selgelt interpreteeritavale ja usaldusväärsele mustrile. Selliste vigade parandamine võimaldas saada täpsemaid tulemusi ning vältida ebatõenäoliste alleelide kasutamist edasises analüüsis. Samuti tuli andmetöötlusest geneetilise mustri tuvastamiseks jätta kõrvale 44 isendit, kellel lõpptulemusena puudus informatsioon rohkem kui ühe lookuse kohta. Kalad, kellel puudusid andmed vaid ühe lookuse kohta, jäeti analüüsi sisse (kokku 256). Selline väljapraakimine võimaldas suurendada tulemuste usaldusväärsust.

Kogutud materjali jagunemist erinevateks populatsioonideks kontrolliti programmi Structure abil. Tulemustest selgus, et suurima tõenäosusega kuuluvad kõik analüüsitud kalad vaid ühte populatsiooni. Väikese tõenäosusega esitas programm siiski ka võimaluse, et kogutud proovid võivad jaguneda kahte erinevasse populatsiooni. Tabelist 3 ja joonistelt 4 ja 5 nähtub, et jagunemine kahte erinevasse populatsiooni on vaid väga oletuslik; ei järgi mingisugust geograafilist mustrit ega oma seetõttu loogilist alust. Kuna ka  $F_{ST}$  statistika kahe võimaliku grupi vahel oli väga väike ( $F_{ST} = 0,01304$ ) ning kõrvalekallet Hardy-Weinbergi tasakaalust täheldati kõikide analüüsis esindatud gruppide puhul nii ühe kui kahe populatsiooni teooria korral, siis võib käesoleva töö tulemuste põhjal oletada siiski vaid ühe panmiktilise populatsiooni olemasolu. On võimalik, et kui kaasata edaspidi sarnastesse uurimustesse rohkem lookusi, saab ka gruppidevahelist geneetilist mitmekesisust täpsemalt kirjeldada. Kirjanduse põhjal võiks huvi pakkuda näiteks lookus Cpa 112, mis mitmete

teadlaste väitel on selektiivse surve all, sõltudes vee soolsusest kudealadel (Larsson *et al.*, 2007; Gaggiotti *et al.*, 2009).

Varem avaldatud töodes on kirjeldatud geneetilise barjääri olemasolu Läänemere põhja- ja kirdeosa suurte lahtede ning kesk- ja lõunaosa vahel (Jørgensen *et al.*, 2005). Sellist barjääri käesolevas töös välja ei tule, kuid kui võrrelda siinsete tulemuste populatsioonigeneetilisi karakteristikuid viidatud töös toodutega, siis võib näha, et väärtustelt on need täiesti võrreldavad. Jørgensen *et al.* (2005) uurimuses on  $F_{ST}$  samuti väga madal, maksimaalselt  $F_{ST} = 0,0271$  ning seda ka ainult Rügeni proovide puhul, mida on juba aastakümneid eristunud populatsioonina käsitletud (Heincke, 1898 *ref.* Rannak, 1988) (käesoleva töö materjal Rügeni saare juurest kogutud proove ei sisaldanud). On võimalik, et erinevused viidatud ja käesoleva töö vahel on põhjustatud erinevatest kudemislainetest, mistõttu edaspidistes uuringutes oleks vajalik proovide kogumine korduvalt ühtedelt ja samadelt kudealadelt ning üsna lühikeste ajaintervallide järel.

Tabelist 2 nähtub, et analüüsitud lookuste heterosügootsus on väga kõrge ( $H_O = 0,715 - 0,849$ ) ning alleelide arv suur ( $N_A = 19 - 88$ , keskmiselt 56). Seetõttu on usutav, et valitud meetodika oli asjakohane, kuna erinevused oletatavate populatsioonide vahel oleksid sellise heterosügootsuse astme puhul selgelt esile tulnud. Võib ka järeldada, et Läänemere räimepopulatsioon on väga elujõuline ning väidetavalt geenisiiret takistavad tegurid ei oma nii suurt tähtsust, kui siiani arvatud.

Et võrrelda lookuste arvu ja heterosügootsuse näitajaid, on mõttekas kasutada Shaw *et al.* (1999) uurimust, kus on kasutatud osaliselt samu lookusi, mida ka käesolevas töös (Cpa 123, Cpa 63 ja Cpa 20), ehkki eelnimetatud uurimuse objektiks pole Läänemere *Clupea harengus membras*, vaid Norra vete ja Barentsi mere *C. harengus*. Järgnevas võrdluses on sulgudes antud vastav näitaja käesolevas töös. Lookus Cpa 123 Shaw *et al.* (1999) töös tulemusi ei andnud; lookuse Cpa 20 puhul on neil alleelide arv  $N_A = 27$  (meie töös 57),  $H_O = 0,88$  (0,75) ja  $H_E = 0,94$  (0,95). Lookuse 63 puhul on vastavad tulemused  $N_A = 14$  (19),  $H_O = 0,79$  (0,72),  $H_E = 0,91$  (0,85). Kuna erinevus torkab silma vaid lookuse Cpa 20 alleelide arvus, kuid mitte heterosügootsuse väärtustes, siis võib väita, et käesoleva töö tulemused on varasema uurimusega kooskõlas.

Ehkki Jørgensen *et al.* (2005) näeb oma töös teatud geneetilist distantssi Läänemere põhja- ning kesk- ja lõunaosa räimepopulatsioonide vahel, võib siiski oletada, et need grupid pole diskreetsed üksused, vaid teatud segunemine peab nende vahel kindlasti toimuma, kuna  $F_{ST}$  on väga väike (maksimaalselt  $F_{ST} = 0,0113$ , kui jätta välja Rügeni proovid; reeglina  $<0,05$  on väike,  $0,05 - 0,15$  on keskmine ning  $>0,15$  suur geneetiline erinevus). On mainitud

ka geneetilise distantse olemasolu vee soolsusrežiimi tõttu (Jørgensen *et al.*, 2005; Larsson *et al.*, 2007; Gaggiotti *et al.*, 2009), kuid kuna suuri erinevusi populatsioonide vahel tuvastatud pole, võib oletada, et Läänemere riimveelises ja väga dünaamilises soolsuskeskkonnas ei pruugi siiski soolsus olla see tegur, mis räimerühmituste grupeerumist initsieerib. Norra kevadkuduheeringal – maailma suurimal atlandi heeringa populatsioonil – on täheldatud ühe sigimishooaja vahelejätmist peaaegu pooltel (47%) suguküpsetest isenditest (Engelhard & Heino, 2006). Eeldusel, et selline nähtus võib esineda ka Läänemere heeringal (räimel) ning võttes arvesse mainitud uurimuses viidatud külmema veetemperatuuri positiivset mõju sigimise sagedusele (kudemise vahelejätmise vähenemisele), võib gruppide kujunemise peamiste põhjustena näha räime bioloogiast (nn. paigatruudus kudealadele) ja keskkonnatingimustest (võimalikud veetemperatuurist põhjustatud migratsioonid) põhjustatud tegureid.

On tõenäoline, et Jørgensen *et al.* (2005) töös viidatud grupeerumine küll esineb, kuid see on ilmselgelt väga nõrgalt väljenduv ning vaadeldav ehk ainult võrdlemisi piiratud ajavahemiku jooksul. Ajaliselt laiemalt nähtuna on Läänemeres tõenäoliselt geneetiliselt tegu siiski vaid ühe grupiga. Järgmine selletaoline uuring, selgitamaks räimekarjade grupeerumist Läänemere erinevate piirkondade lõikes, peaks prognoositavalt hõlmama 5 kuni 10 aastat ning proovid tuleks seejuures võtta erinevatelt kudealadelt üsna lühikeste ajavahemike järel. Selline moodus tooks tõenäoliselt suuremat selgust räime populatsioonigeneetika tegelikkusesse.

## KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärk oli töötada välja optimaalne meetod, selgitamaks räime (*Clupea harengus membras* L.) geneetilist mitmekesisust Läänemeres. Analüüsis kasutati 256 Läänemere kuuest erinevast piirkonnast püütud räime DNAd ning viite erinevat vaikse ookeani heeringa *C. pallasii* mikrosatelliitlookust. Töö tulemused näitasid, et kasutatud meetodika oli sobiv ning andis usaldusväärse vastuse püstitatud probleemile. Selgus, et töös kasutatud materjali põhjal polnud võimalik Läänemeres erinevaid räimepopulatsioone geneetiliselt eristada, mis võib viidata selle alamliigi puhul väiksematele takistustele geenisiirdes kui varasemalt arvatud.

Võrreldes käesoleva töö tulemusi varasemate samalaadsete uuringutega, selgus, et populatsioonigeneetiliste parameetrite väärtustes märkimisväärseid erinevusi ei esinenud (Shaw *et al.*, 1999; Jørgensen *et al.*, 2005). Küll aga täheldati Jørgensen *et al.* (2005) töö tulemuste põhjal väikest, kuid statistiliselt oluliseks peetud erinevust Läänemere põhja- ja kirdeosa suurte lahtede ning kesk- ja lõunaosa räimekarjade vahel. Kuna käesolevas töös sellist eristumist ei ilmnenud ning ka Jørgensen *et al.* (2005) töö autorid möönavad, et erinevus on tühine, siis võib järeldada, et kui Läänemeres erinevate piirkondade lõikes ka geneetiliselt eristunud räimekarjad esinevad, pole nad siiski pikema ajaskaalal püsivad ning geneetiliselt võib kogu Läänemere räimepopulatsiooni käsitleda ühe ühikuna.

## SUMMARY

### **Genetic diversity of the Baltic herring (*Clupea harengus membras* L.) in the Baltic Sea**

The main aim of this research was to define and implement suitable method in the study of Baltic herring population structure. Using information for five Pacific herring (*Clupea pallasii*) microsatellite loci in a total of 256 fish collected from six different locations in the Baltic Sea, the genetic differentiation among Baltic herring population was analyzed. Based on the results of this study, it became obvious that this methodology is suitable to give a reliable answer to the questions posed. Based on the material used in the current research, no significant genetic differentiation among the herring population in the Baltic Sea was detected. This may refer that the level of genetic flow in this subspecies is higher than presumed previously.

Results of the current research are in accordance with previous researches (Shaw *et al.*, 1999; Jørgensen *et al.*, 2005) in regard to the value of population genetic parameters, showing negligible differentiations between different herring groups. Very small, but statistically significant differentiations between the northern (northwestern) samples from big gulfs and southern samples (including Baltic Proper) as described in Jørgensen *et al.* (2005) were not detected in current study. Thus, we have put forward hypothesis that even if there are genetically differentiated herring groups in the Baltic Sea, they are not constant at the longer timescale and genetically, herring in the Baltic Sea constitutes only one unit.



## TÄNUAVALDUS

Suurimat ja sügavaimat tänu avaldan oma juhendajale Urmas Saarmale hindamatu abi eest töö teostamisel ja valmimisel; samuti juhendaja Tiit Raidile ning Toomas Saadile TÜ Eesti Mereinstituudist, tänu kellele see projekt teoks sai. Lisaks avaldan tänu TÜ zooloogia laboratooriumile ning Eesti Biokeskusele, kes tegid võimalikuks laboratoorsete analüüside läbiviimise. Samuti tänan Maris Hindriksoni ja Egle Vullat abi eest andmete töötlemisel ning Jaan Lindu tehnilise abi eest. Abi eest proovide kogumisel avaldan tänu Sara Källile ja Folke Hallingule (Finnish Game and Fisheries Research Institute), Mirosław Wyszynskile ja Włodzimierz Grygielile (Sea Fisheries Institute in Gdynia) ning Heli Špilevile ja Jüri Kolgale (TÜ Eesti Mereinstituut). Samuti avaldan suurt tänu Olavi Kaljustele ja Pille Metsalule abi eest andmeanalüüsil ette tulnud tõrgete lahendamisel.

## KIRJANDUSE NIMESTIK

- Aro, E.** 1989. A review of fish migration patterns in the Baltic. *Rapp. P.-v. Réun. Cons. int. Explor. Mer* 190, lk 72-96.
- Ashley, M. V.** 1999. Molecular conservation genetics. Tools for assaying the structure of DNA prove valuable in protecting endangered species. *American Scientist* 87, lk 28-35.
- Bekkevold, D., André, C., Dahlgren, T. G., Clausen, L. A. W., Torstensen, E., Mosegaard, H., Carvalho, G. R., Christensen, T. B., Norlinder, E., Ruzzante, D. E.** 2005. Environmental correlates of population differentiation in Atlantic herring. *Evolution* 59(12), lk 2656-2668.
- Churikov, D., Matsuoka, M., Luan, X., Gray, A. K., Brykov, V. A., Gharrett, A. J.** 2001. Assessment of concordance among genealogical reconstructions from various mtDNA segments in three species of Pacific salmon (genus *Oncorhynchus*). *Molecular Ecology* 10, 2329-2339.
- Einarsson, H.** 1958. The Icelandic herring and racial problems. *Rapp. P.-V. Reun. Cons. Int. Explor. Mer.* 143, 2, lk 45-52.
- Engelhard, G. H., Heino, M.** 2006. Climate change and condition of herring (*Clupea harengus*) explain long-term trends in extent of skipped reproduction. *Oecologia* 149, lk 593-603.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J.** 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14, lk 2611-2620.
- Gabrielsen, T. M., Brochmann, C., Rueness, J.** 2002. The Baltic Sea as a model system for studying postglacial colonization and ecological differentiation, exemplified by the red alga *Ceramium tenuicorne*. *Molecular Ecology* 11, lk 2083-2095.
- Gaggiotti, O. E., Bekkevold, D., Jørgensen, H. B. H., Foll, M., Carvalho, G. R., André, C., Ruzzante, D. E.** 2009. Disentangling the effects of evolutionary, demographic, and environmental factors influencing genetic structure of natural populations: Atlantic herring as a case study. *Evolution* 63-11, lk 2939-2951.
- Grabda, Y.** 1980. *Anisakis simplex* larvae as mean for estimation of origin and migrations of the herrings in the Southern Baltic Sea. In: "Baltic Ecosystems", *Gdynia*, 1980, lk 272-279.

- Gross, R., Kühn, R., Baars, M., Schröder, W., Stein, H., Rottmann, O.** 2001. Genetic differentiation of European grayling populations across the Main, Danube and Elbe drainages in Bavaria. *Journal of Fish Biology* 58, lk 264-280.
- Gross, R., Kohlmann, K., Kersten, P.** 2002. PCR-RFLP analysis of the mitochondrial *ND-3/4* and *ND-5/6* gene polymorphisms in the European and East Asian subspecies of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 204, lk 507-516.
- Guinand, B., Lemaire, C., Bonhomme, F.** 2004. How to detect polymorphisms undergoing selection in marine fishes? A review of methods and case studies, including flatfishes. *Journal of Sea Research* 51, lk 167-182.
- Hansen, M. M., Nielsen, E. E., Ruzzante, D. E., Bouza, C., Mensberg, K.-L.** 2000. Genetic monitoring of supportive breeding in brown trout (*Salmo trutta* L.), using microsatellite DNA markers. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, lk 2130-2139.
- Hansen, M. M., Kenchington, E., Nielsen, E. E.** 2001. Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers. *Fish and Fisheries* 2, lk 93-112.
- Hauser, L., Ward, R. D.** 1998. Population identification in pelagic fish: the limits of molecular markers. *Advances in Molecular Ecology* (ed. G. R. Carvalho), IOS Press, Amsterdam, lk 191-224.
- Hauser, L., Turan, C., Carvalho, G. R.** 2001. Haplotype frequency distribution and discriminatory power of two mtDNA fragments in a marine pelagic teleost (Atlantic herring, *Clupea harengus*). *Heredity* 87, lk 621-630.
- Hedrick, P. W.** 1983. Genetics of populations. *Wadsworth International, London*. 629 lk.
- Hewitt, G. M.** 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405, lk 907-913.
- Hourston, A. S.** 1982. Homing by Canada's west coast herring to management units and divisions as indicated by tag recoveries. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39, lk 1414-1422.
- ICES, 2009.** Report of the Baltic International Fish Survey Working Group. *ICES CM 2009/LRC:05 Ref. TSGUR, ACOM*. 69 lk.
- Jørgensen, H. B. H., Hansen, M. M., Bekkevold, D., Ruzzante, D. E., Loeschcke, V.** 2005. Marine landscapes and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. *Molecular Ecology* 14, lk 3219-3234.
- Järvekülg, A.** 1979. Läänemere idaosa põhjaloomastik. *Tallinn, Valgus*, 381 lk (vene keeles).
- Lambert, T. C.** 1987. Duration and intensity of spawning in herring *Clupea harengus* as related to the age structure of the mature population. *Marine Ecology - Progress Series* 39, lk 209-220.

- Landry, C., Bernatchez, L.** 2001. Comparative analysis of population structure across environments and geographical scales at major histocompatibility complex and microsatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Molecular Ecology* 10, lk 2525-2539.
- Larsson, L. C., Laikre, L., Palm, S., André, C., Carvalho, G. R., Ryman, N.** 2007. Concordance of allozyme and microsatellite differentiation in a marine fish, but evidence of selection at a microsatellite locus. *Molecular Ecology* 16, lk 1135-1147.
- McConnell, S. K. J., Ruzzante, D. E., O'Reilly, P. T., Hamilton, L., Wright, J. M.** 1997. Microsatellite loci reveal highly significant genetic differentiation among Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) stocks from the east coast of Canada. *Molecular Ecology* 6, 1075-1089.
- McPherson, A. A., Stephenson, R. L., O'Reilly, P. T., Jones, M. W., Taggart, C. T.** 2001. Genetic diversity of coastal Northwest Atlantic herring populations: implications for management. *Journal of Fish Biology* 59 (Suppl. A), lk 356-370.
- McPherson, A. A., O'Reilly, P. T., Taggart, C. T.** 2004. Genetic differentiation, temporal stability, and the absence of isolation by distance among Atlantic herring populations. *Transactions of the American Fisheries Society* 133, lk 434-446.
- McQuinn, I. H.** 1997. Metapopulations and Atlantic herring. *Rev. Fish Biol. Fish.* 7, lk 297-329.
- Miller, K. M., Laberee, K., Schulze, A. D., Kaukinen, K. H.** 2001. Development of microsatellite loci in Pacific herring (*Clupea pallasii*). *Molecular Ecology Notes* 1, lk 131-132.
- Munthe, H.** 1956. On the development of the Baltic herring in the light of the Late Quarternary history of the Baltic. *Arciv. För. Zooloogi* 9, 10, lk 333-341.
- Nei, M.** 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. 512 lk.
- Nielsen, E. E., Hansen, M. M., Ruzzante, D. E., Meldrup, D., Grønkjær, P.** 2003. Evidence of a hybrid-zone in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the Baltic and the Danish Belt Sea, revealed by individual admixture analysis. *Molecular Ecology* 12, lk 1497-1508.
- Nielsen, E. E., Nielsen, P. H., Meldrup, D., Hansen, M. M.** 2004. Genetic population structure of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) supports the presence of multiple hybrid zones for marine fishes in the transition zone between the Baltic Sea and the North Sea. *Molecular Ecology* 13, lk 585-595.

- Nilsson, J., Gross, R., Asplund, T., Dove, O., Jansson, H., Kelloniemi, J., Kohlmann, K., Löytynoja, A., Nielsen, E. E., Paaver, T., Primmer, C. R., Titov, S., Vasemägi, A., Veselov, A., Öst, T., Lumme, J.** 2001. Matrilinial phylogeography of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Europe and postglacial colonization of the Baltic Sea area. *Molecular Ecology* 10, lk 89-102.
- O'Connell, M., Wright, J. M.** 1997. Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7, lk 331-363.
- O'Connell, M., Dillon, M. C., Wright, J. M., Bentzen, P., Merkouris, S., Seeb, J.** 1998a. Genetic structuring among Alaskan Pacific herring populations identified using microsatellite variation. *Journal of Fish Biology* 53, lk 150-163.
- O'Connell, M., Dillon, M. C., Wright, J. M.** 1998b. Development of primers for polymorphic microsatellite loci in the Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*). *Molecular Ecology* 7, lk 357-363.
- Ojaveer, E.** 1981. Influence of temperature, salinity and reproductive mixing of Baltic herring groups on its embryonal development. *Rapp. P.-v. Reun. Cons. Int. Explor. Mer* 178, lk 409-415.
- Ojaveer, E.** 1988. Läänemere heeringad (bioloogia ja tööndus). *Agropromizdat, Moskva*. 204 lk (vene keeles).
- Ojaveer, E.** (ed.) 1995. Ecosystem of the Gulf of Riga between 1920 and 1990. *Estonian Academy Publishers, Tallinn*. 277 lk.
- Ojaveer, E., Elken, J.** 1997. On regional subunits in the ecosystem of the Baltic Sea. *Proc. 14th BMB Symp., 5-8 August 1995. Estonian Academy Publishers*, lk 156-169.
- Ojaveer, E.** 2003. Baltic herring *Clupea harengus membras*. In: *Ojaveer, E., Pihu, E., Saat, T.* (eds) *Fishes of Estonia. Estonian Academy Publishers*, lk 58-79.
- Olsen, J. B., Lewis, C. J., Kretschmer, E. J., Wilson, S. L., Seeb, J. E.** 2002. Characterization of 14 tetranucleotide microsatellite loci derived from Pacific herring. *Molecular Ecology Notes* 2, lk 101-103.
- Olsen, J. L., Stam, W. T., Coyer, J. A., Reusch, T. B. H., Billingham, M., Boström, C., Calvert, E., Christie, H., Granger, S., la Lumière, R., Milchakova, N., Oudot-Le Secq, M.-P., Procaccini, G., Sanjabi, B., Serrão, E., Veldsink, J., Widdicombe, S., Wyllie-Echeverria, S.** 2004. North Atlantic phylogeography and large-scale population differentiation of the seagrass *Zostera marina* L. *Molecular Ecology* 13, lk 1923-1941.
- Paetkau, D., Calvert, W., Sterling, I., Strobeck, C.** 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4, lk 347-354.

- Peakall, R., Smouse, P. E.** 2005. GenAlEx v6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *The Australian National University, Canberra, Australia*
- Podolska, M., Horbowy, J.** 2002. Infection of Baltic herring (*Clupea harengus membras*) with *Anisakis simplex* larvae, 1992-1999: a statistical analysis using generalized linear models. *ICES Journal of Marine Science* 60, lk 85-93.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P.** 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, lk 945-959.
- Rannak, L.** 1988. Rääm. *Tallinn, Valgus*. 128 lk.
- Raymond, M., Rousset, F.** 1995. Genepop (version 1.2): a population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, lk 248-249.
- Ruzzante, D. E., Taggart, C. T., Cook, D.** 1998. A nuclear DNA basis for shelf- and bank-scale population structure in northwest Atlantic cod (*Gadus morhua*): Labrador to Georges Bank. *Molecular Ecology* 7, lk 1663-1680.
- Ruzzante, D. E., Mariani, S., Bekkevold, D., André, C., Mosegaard, H., Clausen, L. A. W., Dahlgren, T. G., Hutchinson, W. F., Hatfield, E. M. C., Torstensen, E., Brigham, J., Simmonds, E. J., Laikre, L., Larsson, L. C., Stet, R. J. M., Ryman, N., Carvalho, G. R.** 2006. Biocomplexity in a highly migratory pelagic marine fish, Atlantic herring. *Proc. R. Soc. B* 273, lk 1459-1464.
- Shaw, P. W., Turan, C., Wright, J. M., O'Connell, M., Carvalho, G. R.** 1999. Microsatellite DNA analysis of population structure in Atlantic herring (*Clupea harengus*), with direct comparison to allozyme and mtDNA RFLP analyses. *Heredity* 83, lk 490-499.
- Svetovidov, A. N.** 1952. Heeringlased (*Clupeidae*). *Fauna SSSR, Kalad* 2, 330 lk (vene keeles)
- Vasemägi, A., Gross, R., Paaver, T., Kangur, M., Nilsson, J., Eriksson, L.-O.** 2001. Identification of the origin of an Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) population in a recently recolonized river in the Baltic Sea. *Molecular Ecology* 10, lk 2877-2882.
- Vasemägi, A., Nilsson, J., Primmer, C. R.** 2005. Expressed sequence tag-linked microsatellites as a source of gene-associated polymorphisms for detecting signatures of divergent selection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Molecular Biology and Evolution* 22, lk 1067-1076.
- Weir, B. S., Cockerham, C. C.** 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, lk 1358-1370.

**Wheeler, J. P., Winters, G. H.** 1984. Homing of Atlantic herring (*Clupea harengus harengus*) in Newfoundland waters as indicated by tagging data. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41, lk 108-117.

**LISA 1.** Programmi MegaBace Genetic Profiler abil koostatud alleelipikkuste tabel.

	Cpa 125		Cpa 63		Cpa 123		Cpa 104		Cpa 20	
P1	267	307	151	151	141	163	180	198	218	220
P2	327	329	149	149	149	153	196	216	218	244
P3	329	331	145	149	161	169	170	216	210	214
P4	281	281	147	149	167	189	196	206	246	250
P5	279	291	149	155	159	195	170	176	206	214
P6	279	319	153	153			170	176	198	214
P7	285	287	147	153	165	193	170	178	210	230
P8	221	223	145	163	144	144	170	196	212	212
P9	211	235	123	127	157	163	170	170	198	216
P10	301	301	151	153	147	153	170	196	220	220
P11	295	313	151	153	165	167	182	196	214	214
P12	309	317	151	153	155	161	170	200	196	198
P13	289	323	151	151	151	163	184	186	206	218
P14	295	295	149	149	147	159	170	170	202	202
P15	279	315			191	191	170	216	220	220
P16	303	335	149	155	147	161	170	188	202	206
P17	277	277	149	153	189	189	176	176	196	200
P18	289	321	149	149	177	179	182	186	220	220
P19	319	327	153	153	161	189	170	188	270	270
P20	315	349	149	155	145	157	170	212	208	208
P21	299	309	149	159	153	153	170	170	196	218
P22	285	327	153	159	155	157	120	126	222	240
P23	173	177	149	155			184	196	196	202
P24	305	317	151	155	165	181	170	216	210	210
P25	135	151	151	155			170	170	202	202
P26	313	315	149	153					214	214
P27	307	309	145	149	155	159	170	208	200	212
P28	321	335	153	157	147	169	170	170	206	240
P29	205	207	149	149	155	169	170	216	222	244
P30	207	221	149	157	171	173			218	218
P31	181	199					170	170	208	208
P32	293	305	151	155	159	161	170	196	208	208
P33	319	325	153	153	155	157	170	198	180	186
P34	311	317	155	155	159	163	170	180	256	258
P35	283	311	147	153	159	167	170	188	206	214
P36	179	181	159	163	157	157	170	200	198	208
P37	279	279	149	153	125	133	170	170	210	260
P38	297	315	151	159	151	153			212	218
P39	277	303	151	151	149	149	170	210	206	258
P40	315	327	149	155	147	147	170	226	214	214
P41	323	325					170	170	204	228
P42	309	311	153	167	159	159	170	170	212	212
P43			153	153	175	177			206	264
P44	279	321	151	153	149	151	198	208	218	218
P45	305	307	153	153	165	181	170	170	210	210
P46	259	289	153	155	151	151	170	170	194	206
P47	279	291	149	167	157	157	170	216	208	208



	Cpa 125		Cpa 63		Cpa 123		Cpa 104		Cpa 20	
P48	321	339	151	151	151	151	170	176	196	198
P49	319	321	155	155	165	173	184	196	224	264
P50	309	333	149	169	153	157	176	182	210	254
N1	313	329	149	163	171	177	170	170	214	214
N2	297	329	149	155	127	157	166	188	210	222
N3			153	153	143	145			196	216
N4	301	303	149	149	149	151	164	166	214	214
N5	315	329	155	159	141	147	164	170	214	230
N6	263	289	151	151	163	169			212	212
N7	309	311	153	157			170	174	212	250
N8	289	291	149	149	161	189	170	204	206	230
N9			147	149	155	157			198	212
N10	171	187					170	170	204	206
N11	329	329	151	163	167	167	170	170	214	232
N12	319	327	149	163	161	163	172	172		
N13			167	167	137	167			206	214
N14	287	309	151	163	149	151	176	216	218	264
N15	279	345	165	165	155	157	170	202		
N16	259	323	147	155	151	163	170	170	206	214
N17	279	315	153	153	145	155	170	170	222	222
N18	269	283	153	153	145	145			214	214
N19	277	279			153	163	136	136	202	216
N20	195	201	145	145	147	159	170	250	218	218
N21	299	311	159	159	171	173	170	170	208	246
N22	317	327	147	159			170	196	222	250
N23	279	279	145	151	149	157	174	178		
N24	279	305	151	153	137	161	158	158		
N25	291	311			149	155				
N26	321	323	153	159	157	175	170	198		
N27	317	319	151	151	179	181	170	208	208	234
N28	305	317	163	163	145	153	170	170	212	220
N29	279	279	155	159	141	147	170	192	218	244
N30	291	323	149	151	149	163			206	206
N31	305	315	147	155	165	167	172	180	212	218
N32	299	331	153	165	149	163	170	198	210	226
N33	321	337	151	151			150	150		
N34	329	329	149	157	149	157				
N35	195	211	151	157	193	193	160	160		
N36	325	331	149	151	149	161	170	198		
N37	181	211			133	135	158	162	206	206
N38	263	263	149	149	143	151	170	196	198	206
N39	327	329	151	153	159	159	170	176	200	200
N40	279	289					172	200	198	210
N41									204	266
N42	313	327	145	159	167	167	176	176	200	206
N43	283	285	153	153	149	153	170	170	212	240
N44	265	267	151	155	149	159	170	198		
N45	335	337	151	151	151	157	170	198	218	276
N46	273	329	147	161	159	173	170	170	206	206
N47			151	155	139	153	196	196	234	250

	Cpa 125		Cpa 63		Cpa 123		Cpa 104		Cpa 20	
N48	333	333	149	149	151	161	174	216	206	230
N49	291	293	149	151	147	151	170	170	212	240
N50	305	305	153	153	149	153			206	214
Sr1	207	241	153	153	161	175	168	186	224	224
Sr2	279	279	149	155	151	151	170	190	206	212
Sr3	279	309	149	151	153	153	174	196	200	212
Sr4	297	299	149	149	163	179			212	218
Sr5			153	155	163	179	170	198	124	124
Sr6	303	305	151	153	155	165	170	170	210	230
Sr7	283	283	149	149	163	177			220	234
Sr8	279	291	151	153	127	149	170	170		
Sr9	287	289	145	155			170	170	222	248
Sr10	309	321	151	151	177	177	166	166	204	212
Sr11	327	329	157	157	139	153			218	218
Sr12	311	313	155	163	151	163	172	174	206	206
Sr13	325	327	155	155					206	228
Sr14	293	295	151	155	151	183			222	260
Sr15	315	317	153	163	93	101	96	96	206	222
Sr16	219	229			155	157	170	170	206	242
Sr17	323	325	131	135			174	174		
Sr18	283	305	151	151					210	248
Sr19			151	157	159	169	154	162	136	148
Sr20	213	225	149	155			170	198	206	212
Sr21					143	147	174	198	218	242
Sr22			153	153	153	161	170	170	208	210
Sr23	291	291			151	161	170	198	206	212
Sr24	295	329	149	155	145	149	170	206	204	206
Sr25	309	311	149	153	161	189	184	218	254	256
Sr26			151	153	145	165	170	186	206	206
Sr27	315	317	149	153	159	171	170	198	240	254
Sr28	311	327	151	153	149	161	172	198	220	222
Sr29	229	237	151	153			102	128	220	222
Sr30	375	375	151	151	153	153	170	200	206	228
Sr31			145	153	153	155				
Sr32	291	293	149	153			150	158	210	210
Sr33	309	325	149	159	149	151	170	218	216	250
Sr34	265	331	149	149	159	169	170	214	198	212
Sr35	303	309	151	163	177	179	170	170	214	214
Sr36	297	319	153	155			170	194	210	236
Sr37	267	333	151	163	151	151	170	208	210	210
Sr38	305	307	151	163			170	198	202	214
Sr39	265	267	145	153	147	151	170	174	212	212
Sr40	311	313	153	153	145	145	166	170	216	218
Sr41	291	317			169	173	178	178	210	214
Sr42	263	289	147	151	157	159	178	192	214	218
Sr43			153	153	157	157	174	174	214	214
Sr44	303	305	149	149	145	155	170	170		
Sr45	289	289	149	153	159	159	176	200	222	222
Sr46	311	313	149	149	159	181			206	230
Sr47	303	305	147	151			170	170	212	218

	Cpa 125		Cpa 63		Cpa 123		Cpa 104		Cpa 20	
Sr48	283	283	151	155	135	157	174	200	206	206
Sr49	289	291	149	153	157	179	176	176	238	238
Sr50	317	319	149	151			170	170	206	206
G1	329	329			151	189	170	196		
G2	327	329	149	155			170	170	218	218
G3	291	293	149	149	143	171			206	226
G4	279	285	147	147	139	159				
G5	327	341	153	163	159	181			208	214
G6	351	371	149	157			134	160	156	228
G7	291	319			167	169	178	178	234	234
G8	327	329	153	153	187	187	134	192	158	160
G9	263	291	143	149	157	185	170	170		
G10	317	327	153	157	97	109	170	196	196	208
G11	327	329	149	155	155	159	182	186	220	232
G12	263	265	157	163	181	201	186	196	214	214
G13	297	299	151	157	149	165	170	192	236	272
G14	309	311	147	153			174	174	226	264
G15	157	161	151	155			174	210	206	220
G16	265	301			153	161	184	200	204	210
G17	265	323	99	103	167	171	174	174	146	148
G18			153	155			170	170	204	272
G19	111	127	151	153						
G20	151	159	153	153	149	151	170	174	200	218
G21	319	321	153	163	151	251	170	170	198	244
G22	331	333	151	155	203	205	174	216	198	260
G23	295	309	145	149			174	174		
G24	327	329			153	153	170	194	208	218
G25	169	171	151	159	159	159			202	222
G26	227	253	153	155			170	196	274	274
G27	329	331	153	153	105	107			206	260
G28			151	153			176	198		
G29	307	329	151	153	147	189	124	180	228	228
G30	193	217	153	157			166	216	170	210
G31	327	329	149	155	89	91	128	186	222	244
G32	207	225	149	151	155	167	154	154		
G33	291	293	149	153	161	173	170	170	214	214
G34	291	313	149	153	169	171	170	214	194	210
G35			149	149			170	198	206	206
G36	163	293			131	133			168	200
G37	329	329	149	157	159	165	170	170		
G38	255	257					170	170	154	266
G39	291	313	151	159	157	161	180	180	212	216
G40	265	323	151	155	173	173	170	178		
G41	265	267							216	216
G42	279	301	155	159	163	181	186	194	216	216
G43	101	115	151	151			74	80	206	210
G44	225	231	151	151	153	181	174	212	210	214
G45	273	307	147	155	145	165	188	188	210	232
G46	287	305	145	149	147	153	170	170	206	230
G47	313	337	149	151	163	175	170	200	180	210

	Cpa 125		Cpa 63		Cpa 123		Cpa 104		Cpa 20	
G48	139	147	155	161	173	189	170	228	196	228
G49	263	301					172	186	224	240
G50	325	327	149	167	147	159	176	196	172	174
A1			147	153	121	121			210	210
A2	203	203	153	167	137	177	184	198	214	214
A3	177	179	151	155	159	179	170	196	200	228
A4	279	279	151	153	131	137	170	196	202	206
A5	329	329	147	155	135	135	170	210	154	210
A6	301	323	151	155	89	97			210	210
A7	329	329	149	155					210	250
A8	303	305	151	163	135	137			230	246
A9	323	325			137	149			220	220
A10	203	219	145	149	147	161	170	190	198	206
A12	191	197	151	167	151	151	170	192	160	220
A13	291	323	149	159	147	149	170	194	246	246
A14	317	319	151	153	179	277			154	164
A15	283	317	153	155	179	187	182	222		
A16	311	313	155	157			170	234	214	242
A17	313	315	149	151	145	157	186	208	214	218
A18	171	171							208	218
A19	245	245	145	157	159	163	170	170	204	252
A20	309	311	147	155					204	212
A21	175	175	155	155	147	149	188	198	156	280
A22	327	329	151	151	159	165			196	200
A23	327	329	151	151					196	198
A24	259	291	151	151	149	187	250	262	210	210
A25	257	315			209	333	198	200	220	220
A26	315	327	153	155	151	151	170	188	210	214
A27	285	287	151	151	125	125	188	250	204	250
A28	297	329	151	155	107	117	170	182	206	264
A29	327	329	151	153	207	207	170	232	204	264
A30	205	205	153	157	161	171			198	278
A31	299	327	145	145	193	193	170	184	204	258
A32	297	297	151	151	161	195	226	228	218	218
A33	229	229	149	153	147	161	164	164	206	226
A34	315	315	145	157	153	155	176	212	208	214
A35	279	279	149	151					250	250
A36	291	307	157	161	151	155	170	208	202	254
A37	263	263	155	161					210	222
A38			157	157	157	173	184	196	222	240
A39	279	327	153	153	149	159	170	208	212	212
A40	287	289	155	155	163	169	170	170	162	202
A41	279	317	153	155	151	151	182	198	206	210
A42	291	331	151	151	127	133	196	196	206	232
A43	283	305	153	169	149	173			206	260
A44	279	303	147	153	151	159			200	222
A45			151	157	117	119	100	132	130	130
A46	265	265	149	151	151	179	170	170	206	214
A47			151	155	167	169	182	196	212	244
A48	263	321	153	163	141	177	170	202	206	222

	Cpa 125		Cpa 63		Cpa 123		Cpa 104		Cpa 20	
A49	313	313	153	167	147	147	170	198	200	212
A50	291	291	145	145			170	196	208	214
A51	267	313	149	151	163	167	166	170	196	212
B1	315	317	153	159	145	171			202	214
B2	307	319	151	167	125	129	170	170	248	258
B3			151	155	197	201			196	198
B4	291	293	149	155	149	151			216	274
B5	291	291	91	93					202	232
B6	291	311	149	153	121	123			232	254
B7	303	305	153	157	151	151				
B8	267	311	153	153	155	195	182	230	124	164
B9	294	296			151	151			206	212
B10			151	151	159	205	154	162	210	212
B11	321	333	145	147			170	224		
B12	263	279	151	153	145	163	156	180	204	216
B13	307	307	151	155	141	169	184	184	206	212
B14			147	153	147	155	170	180	248	272
B15	163	169	153	155	161	181	182	196	208	234
B16	303	315	151	151	149	189	180	230	200	202
B17			149	153	151	153	174	198		
B18	301	303	153	153	151	161			222	280
B19			149	149	159	191	170	206	214	218
B20			153	163	149	149	90	104	208	212
B21	279	279	151	151			170	170	198	240
B22	309	319	145	151			170	174	248	248
B23			153	169	149	167	196	222	236	236
B24	335	337	151	157	197	199	170	196	248	248
B25	239	251			165	193	170	198	206	208
B26	177	205	153	153	153	157	170	196	206	210
B27					89	143			206	208
B28	285	285	153	155	91	91			212	228
B29	197	209	153	157	179	181	178	178	202	268
B30	331	333	149	151	171	177	170	170	218	248
B31	203	211	149	151	149	167			202	278
B32	237	239			145	145	170	184	208	212
B33	315	317	145	151	179	199			212	224
B34	325	327			159	161	170	192	206	248
B35	305	307	153	157	147	173	170	196	214	216
B36			153	167	149	151	178	180	208	214
B37	179	209	149	157	155	155			206	240
B38			151	151	149	149	174	198	214	218
B39	279	303	151	161	143	159	198	212	206	206
B40	289	291	145	149					210	266
B41	309	311	145	153	125	131	188	216	202	206
B42	281	281	151	155	153	179			216	222
B43	259	285			121	183	182	198	210	244
B44	291	303	151	155	143	145	170	198	202	232
B45	301	331	147	147	149	159	170	176	206	230
B46	279	279	153	153	147	173	170	170	206	216
B47	287	305	145	165	155	213	170	176	218	218

	Cpa 125		Cpa 63		Cpa 123		Cpa 104		Cpa 20	
B48	321	323	149	159	161	179	170	222	210	222
B49	289	333	151	163	143	171	170	210	210	234
B50	303	315	141	145	157	167	170	170	208	220

**LISA 2.** Analüüsitud indiviidide kuulumine kahte hüpoteetilisse populatsiooni programmi Structure järgi. Viimases kahes tulbas on näha isendi kuulumise tõenäosuse arvväätus (max 1,0)

**Run parameters:**

256 individuals  
5 loci  
2 populations assumed  
70000 Burn-in period  
700000 Reps

Inferred ancestry of individuals:

	Label	(%Miss)	Pop:	Inferred clusters
1	P1	(0)	1 :	0.327 0.673
2	P2	(0)	1 :	0.303 0.697
3	P3	(0)	1 :	0.208 0.792
4	P4	(0)	1 :	0.831 0.169
5	P5	(0)	1 :	0.149 0.851
6	P6	(20)	1 :	0.177 0.823
7	P7	(0)	1 :	0.638 0.362
8	P8	(0)	1 :	0.781 0.219
9	P9	(0)	1 :	0.857 0.143
10	P10	(0)	1 :	0.330 0.670
11	P11	(0)	1 :	0.196 0.804
12	P12	(0)	1 :	0.591 0.409
13	P13	(0)	1 :	0.334 0.666
14	P14	(0)	1 :	0.191 0.809
15	P15	(20)	1 :	0.323 0.677
16	P16	(0)	1 :	0.348 0.652
17	P17	(0)	1 :	0.623 0.377
18	P18	(0)	1 :	0.485 0.515
19	P19	(0)	1 :	0.803 0.197
20	P20	(0)	1 :	0.341 0.659
21	P21	(0)	1 :	0.272 0.728

22	P22	(0)	1 : 0.869 0.131
23	P23	(20)	1 : 0.873 0.127
24	P24	(0)	1 : 0.323 0.677
25	P25	(20)	1 : 0.731 0.269
26	P27	(0)	1 : 0.126 0.874
27	P28	(0)	1 : 0.484 0.516
28	P29	(0)	1 : 0.763 0.237
29	P30	(20)	1 : 0.712 0.288
30	P32	(0)	1 : 0.170 0.830
31	P33	(0)	1 : 0.827 0.173
32	P34	(0)	1 : 0.669 0.331
33	P35	(0)	1 : 0.198 0.802
34	P36	(0)	1 : 0.753 0.247
35	P37	(0)	1 : 0.515 0.485
36	P38	(20)	1 : 0.229 0.771
37	P39	(0)	1 : 0.579 0.421
38	P40	(0)	1 : 0.152 0.848
39	P42	(0)	1 : 0.106 0.894
40	P44	(0)	1 : 0.119 0.881
41	P45	(0)	1 : 0.224 0.776
42	P46	(0)	1 : 0.297 0.703
43	P47	(0)	1 : 0.144 0.856
44	P48	(0)	1 : 0.452 0.548
45	P49	(0)	1 : 0.858 0.142
46	P50	(0)	1 : 0.609 0.391
47	N1	(0)	2 : 0.078 0.922
48	N2	(0)	2 : 0.724 0.276
49	N4	(0)	2 : 0.117 0.883
50	N5	(0)	2 : 0.172 0.828
51	N6	(20)	2 : 0.263 0.737
52	N7	(20)	2 : 0.474 0.526
53	N8	(0)	2 : 0.353 0.647
54	N11	(0)	2 : 0.170 0.830
55	N12	(20)	2 : 0.372 0.628



56	N14	(0)	2 : 0.327 0.673
57	N15	(20)	2 : 0.788 0.212
58	N16	(0)	2 : 0.203 0.797
59	N17	(0)	2 : 0.170 0.830
60	N18	(20)	2 : 0.242 0.758
61	N19	(20)	2 : 0.634 0.366
62	N20	(0)	2 : 0.655 0.345
63	N21	(0)	2 : 0.369 0.631
64	N22	(20)	2 : 0.549 0.451
65	N23	(20)	2 : 0.184 0.816
66	N24	(20)	2 : 0.495 0.505
67	N26	(20)	2 : 0.597 0.403
68	N27	(0)	2 : 0.487 0.513
69	N28	(0)	2 : 0.096 0.904
70	N29	(0)	2 : 0.269 0.731
71	N30	(20)	2 : 0.206 0.794
72	N31	(0)	2 : 0.156 0.844
73	N32	(0)	2 : 0.640 0.360
74	N35	(20)	2 : 0.947 0.053
75	N36	(20)	2 : 0.387 0.613
76	N37	(20)	2 : 0.913 0.087
77	N38	(0)	2 : 0.206 0.794
78	N39	(0)	2 : 0.139 0.861
79	N42	(0)	2 : 0.167 0.833
80	N43	(0)	2 : 0.379 0.621
81	N44	(20)	2 : 0.214 0.786
82	N45	(0)	2 : 0.678 0.322
83	N46	(0)	2 : 0.342 0.658
84	N47	(20)	2 : 0.833 0.167
85	N48	(0)	2 : 0.195 0.805
86	N49	(0)	2 : 0.100 0.900
87	N50	(20)	2 : 0.092 0.908
88	Sr1	(0)	3 : 0.935 0.065
89	Sr2	(0)	3 : 0.123 0.877

90	Sr3	(0)	3 : 0.139 0.861
91	Sr4	(20)	3 : 0.469 0.531
92	Sr5	(20)	3 : 0.769 0.231
93	Sr6	(0)	3 : 0.143 0.857
94	Sr7	(20)	3 : 0.483 0.517
95	Sr8	(20)	3 : 0.223 0.777
96	Sr9	(20)	3 : 0.480 0.520
97	Sr10	(0)	3 : 0.457 0.543
98	Sr11	(20)	3 : 0.619 0.381
99	Sr12	(0)	3 : 0.167 0.833
100	Sr14	(20)	3 : 0.679 0.321
101	Sr15	(0)	3 : 0.842 0.158
102	Sr16	(20)	3 : 0.767 0.233
103	Sr19	(20)	3 : 0.909 0.091
104	Sr20	(20)	3 : 0.614 0.386
105	Sr22	(20)	3 : 0.220 0.780
106	Sr23	(20)	3 : 0.093 0.907
107	Sr24	(0)	3 : 0.346 0.654
108	Sr25	(0)	3 : 0.803 0.197
109	Sr26	(20)	3 : 0.201 0.799
110	Sr27	(0)	3 : 0.294 0.706
111	Sr28	(0)	3 : 0.373 0.627
112	Sr29	(20)	3 : 0.910 0.090
113	Sr30	(0)	3 : 0.803 0.197
114	Sr32	(20)	3 : 0.623 0.377
115	Sr33	(0)	3 : 0.505 0.495
116	Sr34	(0)	3 : 0.296 0.704
117	Sr35	(0)	3 : 0.106 0.894
118	Sr36	(20)	3 : 0.802 0.198
119	Sr37	(0)	3 : 0.167 0.833
120	Sr38	(20)	3 : 0.130 0.870
121	Sr39	(0)	3 : 0.110 0.890
122	Sr40	(0)	3 : 0.124 0.876
123	Sr41	(20)	3 : 0.276 0.724

124	Sr42	(0)	3	: 0.229	0.771
125	Sr43	(20)	3	: 0.178	0.822
126	Sr44	(20)	3	: 0.096	0.904
127	Sr45	(0)	3	: 0.375	0.625
128	Sr46	(20)	3	: 0.135	0.865
129	Sr47	(20)	3	: 0.090	0.910
130	Sr48	(0)	3	: 0.671	0.329
131	Sr49	(0)	3	: 0.506	0.494
132	Sr50	(20)	3	: 0.233	0.767
133	G1	(40)	4	: 0.352	0.648
134	G2	(20)	4	: 0.161	0.839
135	G3	(20)	4	: 0.304	0.696
136	G5	(20)	4	: 0.330	0.670
137	G6	(20)	4	: 0.944	0.056
138	G7	(20)	4	: 0.558	0.442
139	G8	(0)	4	: 0.920	0.080
140	G9	(20)	4	: 0.560	0.440
141	G10	(0)	4	: 0.806	0.194
142	G11	(0)	4	: 0.490	0.510
143	G12	(0)	4	: 0.382	0.618
144	G13	(0)	4	: 0.847	0.153
145	G14	(20)	4	: 0.581	0.419
146	G15	(20)	4	: 0.863	0.137
147	G16	(20)	4	: 0.673	0.327
148	G17	(0)	4	: 0.867	0.133
149	G20	(0)	4	: 0.464	0.536
150	G21	(0)	4	: 0.550	0.450
151	G22	(0)	4	: 0.849	0.151
152	G24	(20)	4	: 0.241	0.759
153	G25	(20)	4	: 0.736	0.264
154	G26	(20)	4	: 0.893	0.107
155	G27	(20)	4	: 0.828	0.172
156	G29	(0)	4	: 0.810	0.190
157	G30	(20)	4	: 0.904	0.096

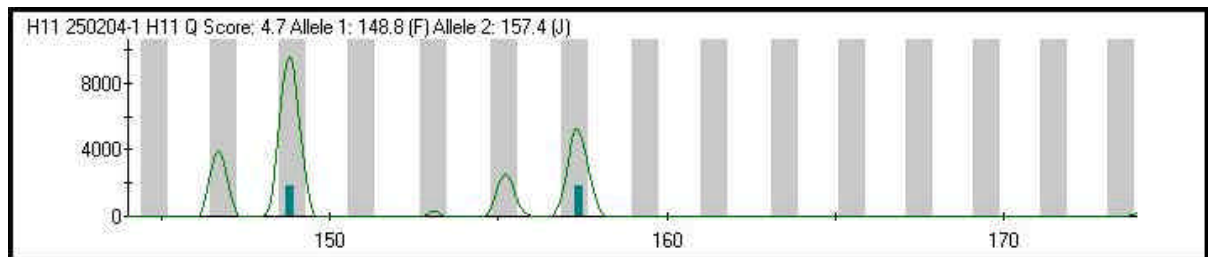
158	G31	(0)	4 : 0.871 0.129
159	G32	(20)	4 : 0.891 0.109
160	G33	(0)	4 : 0.085 0.915
161	G34	(0)	4 : 0.370 0.630
162	G37	(20)	4 : 0.234 0.766
163	G39	(0)	4 : 0.177 0.823
164	G40	(20)	4 : 0.400 0.600
165	G42	(0)	4 : 0.368 0.632
166	G43	(20)	4 : 0.912 0.088
167	G44	(0)	4 : 0.633 0.367
168	G45	(0)	4 : 0.553 0.447
169	G46	(0)	4 : 0.116 0.884
170	G47	(0)	4 : 0.789 0.211
171	G48	(0)	4 : 0.918 0.082
172	G50	(0)	4 : 0.683 0.317
173	A2	(0)	5 : 0.447 0.553
174	A3	(0)	5 : 0.816 0.184
175	A4	(0)	5 : 0.375 0.625
176	A5	(0)	5 : 0.808 0.192
177	A6	(20)	5 : 0.838 0.162
178	A8	(20)	5 : 0.405 0.595
179	A10	(0)	5 : 0.604 0.396
180	A12	(0)	5 : 0.746 0.254
181	A13	(0)	5 : 0.333 0.667
182	A14	(20)	5 : 0.903 0.097
183	A15	(20)	5 : 0.869 0.131
184	A16	(20)	5 : 0.588 0.412
185	A17	(0)	5 : 0.093 0.907
186	A19	(0)	5 : 0.825 0.175
187	A21	(0)	5 : 0.874 0.126
188	A22	(20)	5 : 0.320 0.680
189	A24	(0)	5 : 0.844 0.156
190	A25	(20)	5 : 0.857 0.143
191	A26	(0)	5 : 0.135 0.865

192	A27	(0)	5 : 0.928	0.072
193	A28	(0)	5 : 0.866	0.134
194	A29	(0)	5 : 0.879	0.121
195	A30	(20)	5 : 0.881	0.119
196	A31	(0)	5 : 0.862	0.138
197	A32	(0)	5 : 0.802	0.198
198	A33	(0)	5 : 0.678	0.322
199	A34	(0)	5 : 0.226	0.774
200	A36	(0)	5 : 0.403	0.597
201	A38	(20)	5 : 0.808	0.192
202	A39	(0)	5 : 0.082	0.918
203	A40	(0)	5 : 0.591	0.409
204	A41	(0)	5 : 0.199	0.801
205	A42	(0)	5 : 0.686	0.314
206	A43	(20)	5 : 0.561	0.439
207	A44	(20)	5 : 0.114	0.886
208	A45	(20)	5 : 0.950	0.050
209	A46	(0)	5 : 0.117	0.883
210	A47	(20)	5 : 0.626	0.374
211	A48	(0)	5 : 0.474	0.526
212	A49	(0)	5 : 0.089	0.911
213	A50	(20)	5 : 0.126	0.874
214	A51	(0)	5 : 0.222	0.778
215	B1	(20)	6 : 0.158	0.842
216	B2	(0)	6 : 0.814	0.186
217	B4	(20)	6 : 0.320	0.680
218	B6	(20)	6 : 0.759	0.241
219	B8	(0)	6 : 0.883	0.117
220	B10	(20)	6 : 0.824	0.176
221	B12	(0)	6 : 0.439	0.561
222	B13	(0)	6 : 0.493	0.507
223	B14	(20)	6 : 0.602	0.398
224	B15	(0)	6 : 0.855	0.145
225	B16	(0)	6 : 0.442	0.558

226	B18	(20)	6 : 0.444	0.556
227	B19	(20)	6 : 0.220	0.780
228	B20	(20)	6 : 0.583	0.417
229	B21	(20)	6 : 0.186	0.814
230	B22	(20)	6 : 0.565	0.435
231	B23	(20)	6 : 0.880	0.120
232	B24	(0)	6 : 0.915	0.085
233	B25	(20)	6 : 0.745	0.255
234	B26	(0)	6 : 0.728	0.272
235	B28	(20)	6 : 0.903	0.097
236	B29	(0)	6 : 0.892	0.108
237	B30	(0)	6 : 0.305	0.695
238	B31	(20)	6 : 0.795	0.205
239	B32	(20)	6 : 0.516	0.484
240	B33	(20)	6 : 0.720	0.280
241	B34	(20)	6 : 0.525	0.475
242	B35	(0)	6 : 0.187	0.813
243	B36	(20)	6 : 0.155	0.845
244	B37	(20)	6 : 0.840	0.160
245	B38	(20)	6 : 0.151	0.849
246	B39	(0)	6 : 0.229	0.771
247	B41	(0)	6 : 0.674	0.326
248	B42	(20)	6 : 0.792	0.208
249	B43	(20)	6 : 0.910	0.090
250	B44	(0)	6 : 0.212	0.788
251	B45	(0)	6 : 0.156	0.844
252	B46	(0)	6 : 0.098	0.902
253	B47	(0)	6 : 0.504	0.496
254	B48	(0)	6 : 0.652	0.348
255	B49	(0)	6 : 0.526	0.474
256	B50	(0)	6 : 0.300	0.700

**LISA 3.** Näidis programmi MegaBace Genetic Profiler poolt tuvastatud alleelipikkustest. A – selgelt interpreteeritav ja usaldusväärne; B – ebausaldusväärne (muster ei vasta juhendis toodud usaldusväärsele mustripildile).

(A)



(B)

