

LENDORAVA EESTI ASURKONNA GENEETILINE UURING

Lõpparuanne

Töö teostaja:

SA Lutreola

Reg nr. 90005573

Tallinna Loomaaed

Ehitajate tee 150, 13517, Tallinn

Uuring on finantseeritud SA Keskkonnainvesteeringute Keskuse poolt.

Tallinn 2017

Sisukord

1. Uuringu eesmärk	3
2. Materjalid ja meetodika	4
2.1 Töös kasutatud proovid	4
2.2 Töös kasutatud markerid	4
2.3 DNA eraldus ning polümeraasi ahelreaktsioon	5
2.4 Andmete analüüsiks kasutatud programmid	6
3. Tulemused ja arutelu	7
3.1 Proovide kvaliteet	7
3.2 Mitokondriaalsed markerid	8
3.3 Tuumsed markerid	13
4. Ülegenoomse sekveneerimise võimalikus	18
5. Kokkuvõte	20
6. Kasutatud kirjandus	24

1. Uuringu eesmärk

Lendorava (*Pteromys volans*) Eesti asurkonna geneetilise uuringu eesmärgiks oli selgitada, kas lendorava Eesti, Soome ning Karjala populatsioonid erinevad üksteisest geneetiliselt oluliselt. Seejärel oli ülesandeks selgitada, kui suur on lendorava populatsiooni geneetiline mitmekesisus Eestis ning võrrelda seda Soome ja Karjala lendoravatega. Lisaülesandeks oli uurida ülegonoomse sekveneerimise võimalikkust kolmest populatsioonist pärit isendite alusel.

Lendorava populatsiooni geneetilise hindamise ja analüüsimise aluseks eeldati ühtse meetodikaga kogutud lendorava väljaheiteproovide olemasolu – kokku vähemalt 100-130 proovi. Geneetilise analüüsi läbiviimisel tuli analüüsida vähemalt 10 DNA markerit, mille hulka kuulusid nii mitokondriaalsed kui ka tuumsed markerid.

2. Materjalid ja metoodika

2.1 Töös kasutatud proovid

Uuringu käigus analüüsiti kokku 160 lendorava proovi, millest 148 moodustasid väljaheiteproovid ning 12 olid koeproovid.

Eesti lendoravate proovide kogum koosnes väljaheiteproovidest, mis olid kogutud kolme aasta jooksul. Aastal 2015 kogutud proove oli 33, aastal 2016 kogutud proove oli 58 ning aastal 2017 kogutud proove oli 18. Seega kokku oli Eestist pärit lendoravate proove 109.

Soome lendoravate proovide kogumi (kokku 16 proovi) moodustasid valdavalt koeproovid (12 koeproovi), mis pärinesid erinevatest aastatest (1981-2017) ning väljaheiteproovid (4 väljaheiteproovi), mis pärinesid aastast 2013.

Karjalast pärit lendoravate proovide kogumi moodustasid 35 väljaheiteproovi, mis kõik olid korjatud 2004 aastal.

Kõikide proovide täieliku nimekirja leiab lisast (Lisa 1).

2.2 Töös kasutatud markerid

Töös kasutati 10 DNA markerit, millest 2 olid mitokondriaalsed ja 8 tuumsed. Mitokondriaalsete markeritena kasutati tsütokroom b (CytB) ja mtDNA kontrollregiooni (D-loop) järjestusi. Mitokondriaalsete markerite amplifitseerimiseks mõeldud praimerid olid disainitud Kristiina Kuningas-e magistritöö käigus (Kuningas, 2016). Lendorava tuumsed ehk mikrosatelliitsed markerid on eelnevalt kirjeldatud 2004. aastal (Painter et al., 2004), millest antud töös kasutati Pvol1, Pvol10, Pvol41, Pvol74, PvolE1, PvolE5, PvolE6 ning PvolE10. Käesolevas töös olid tuumsete markerite amplifitseerimiseks ja sellele järgnevas fragmentanalüüsiks sense praimerite 5' otsad märgistatud järgmiselt: Pvol1 (FAM), Pvol10 (HEX), Pvol41 (FAM), Pvol74 (HEX), PvolE1 (HEX), PvolE5 (FAM), PvolE6 (TAMRA) ning PvolE10 (HEX).

2.3 DNA eraldus ning polümeraasi ahelreaktsioon

Kõikide töös kasutatud proovide DNA eraldamisel kasutati QIAamp DNA Stool Mini Kit-i ja eraldus viidi läbi vastavalt tootja protokollile.

Mitokondriaalsete DNA markerite analüüsiks kasutati polümeraasi ahelreaktsiooni (*polymerase chain reaction - PCR*). Reaktsioonisegu sisaldas 1x Maxima Hot Start PCR Master Mix-i (2x) (Thermo Fisher Scientific), 0,4 µg kogureaktsioonis veise seerumi albumiini (BSA), tsütokroom b või D-lingu sens ja antisenss praimereid lõppkontsentratsiooniga 0,5 µM ning 2 µl eraldatud DNA-d. Ensüümi esmane aktiveerimine viidi läbi 96 °C juures 4 minutit, seejärel teostati 40 tsüklit denaturatsiooni 95 °C 30 sekundit, praimerite seondumine 50 °C 30 sekundit, DNA süntees 72 °C 55 sekundit. Kõige lõpus toimus elongatsioon 72 °C 10 minutit. Seejärel kontrolliti PCR-i produkte agarosgeelelektorforeesil ning PCR-i produktid puhastati agarosgeelist GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) abil vastavalt tootja protokollile. Cyt B ja D-lingu järjestused sekveneeriti Tartus Eesti Biokeskuse tuumiklaboris.

Mikrosatelliitsete markerite analüüsiks kasutati Multiplex PCR-i. Reaktsioonisegu koosnes 1x Maxima Hot Start PCR Master Mix-ist (2x) (Thermo Fisher Scientific), 20 µg kogureaktsioonis veise seerumi albumiini (BSA), tuumsete markerite sens ja antisenss praimereid lõppkontsentratsiooniga 0,5 µM ning 3 µl eraldatud DNA-d. Multiplex PCR-iks kombineeriti amplifitseeritavad markerid omavahel järgmiselt: Pvol10 ja PvolE1, Pvol74 ja Pvol1, PvolE5 ja PvolE6, Pvol41 ja PvolE10. PCR-i reaktsioon viidi läbi *touch-down* meetodil, kus ensüümi esmane aktiveerimine viidi läbi 96 °C juures 4 minutit, seejärel viidi läbi 10 tsüklit denaturatsiooni 95 °C 30 sekundit, praimerite seondumine 50 °C 30 sekundit (kusjuures iga tsükliga alanes praimerite seondumistemperatuur 0,5 °C võrra), DNA süntees 72 °C 30 sekundit. Seejärel viidi läbi 25 tsüklit, kus denaturatsioon toimus 95 °C 30 sekundit, praimerite seondumine 45 °C 30 sekundit, DNA süntees 72 °C 30 sekundit. Lõpus toimus elongatsioon 72 °C 10 minutit ning A-nukleotiidi lisamine 60 °C juures 30 minutit. Tuumsed markerid läbisid fragmentanalüüsi Tartus Eesti Biokeskuse tuumiklaboris, kus kasutati pikkusmarkerina GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard (Thermo Fisher Scientific).

2.4 Andmete analüüsiks kasutatud programmid

Sekveneeritud D-ling ja CytB järjestused joondati programmiga BioEdit (Hall, 1999). D-lingu haplotüüpide fülogeneetilise puu loomisel kasutati Neighbor-Joining meetodit ning evolutsioonilised kaugused arvutati Tajima-Nei meetodiga programmiga MEGA7 (Kumar et al., 2016). Tuumsete markerite analüüs viidi esmalt läbi programmiga Peak Scanner™ Software v1.0 (Applied Biosystems) ning seejärel programmiga Genepop on the Web (Rousset, 2008).

3. Tulemused ja arutelu

3.1 Proovide kvaliteet

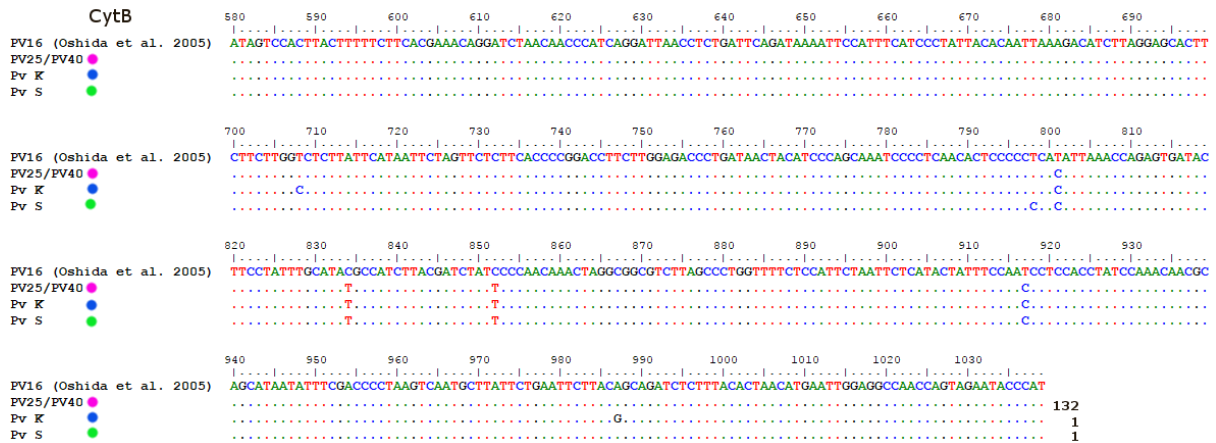
Tuumsete markeritega ei õnnestunud tulemusi saada Karjalast pärit proovide puhul. Põhjuseks oli proovide halb kvaliteet. Esiteks oli fekaalide kogus DNA eraldamiseks liiga väike. QIAamp DNA Stool Mini Kit tootja protokoll järgi läheb DNA eralduseks vaja 180-220 mg materjali kuid käesolevaks tööks saadaval olnud Karjala proovide kaalutis oli 20-57 mg, mis on kuni 10 korda väiksem kogus eraldusprotokollis ettenähtud kogusest. Teiseks olid osad Karjala proovid kuivatatud kujul, ei olnud säilitatud 96% etanoolis, ning olid hoitud pärast korjamist toatemperatuuril. DNA kvaliteet väljaheite proovis sõltub suuresti sellest kui kaua proov on enne kogumist looduses olnud - mida kauem on looduses olnud, seda suurem on DNA degradatsiooni tõenäosus. Antud töös DNA eralduseks kasutatud Karjala proovid on üle kümne aasta vanad, lisaks sellele ei ole nende puhul teada kui kaua nad looduses, ja mis tingimustes, nad enne kogumist viibisid. Lisaks sellele ei olnud neid proove säilitatud peale kogumist degradatsiooni pidurdavates tingimustes. Väljaheidetes on suur kogus inhibiitoreid, nagu näiteks bilirubiin, sapisoolad ja nukleaasid (Deuter et al., 1995), mis kõik aja möödudes degradeerivad DNA-d. Kõikide ebasoodsate tingimuste kokkulangemise põhjusena ei olnud Karjala proovid piisavalt hea kvaliteediga, et analüüsida tuumseid markereid. Sellele vaatamata õnnestus mõningate proovide puhul mitokondriaalsete markerite analüüs. Mitokondriaalse DNA koopiate arv rakus võib varieeruda, vastavalt raku tüübile, 100 – 1000 koopiat raku kohta ning tuumset DNA-d esineb rakus tavaliselt kahe koopiana raku kohta (Satoh and Kuroiwa, 1991). PCR on tundlik meetod ning piisab kümne intaktse DNA molekuli olemasolust reaktsioonisegus, et amplifitseerida marker-järjestusi (Maxima Hot Start Master Mix (2x) infoleht, Thermo Fisher Scientific). Seetõttu osutus mitokondriaalsete markerite analüüs Karjala proovidest edukamaks kui tuumsete markeritega.

3.2 Mitokondriaalsed markerid

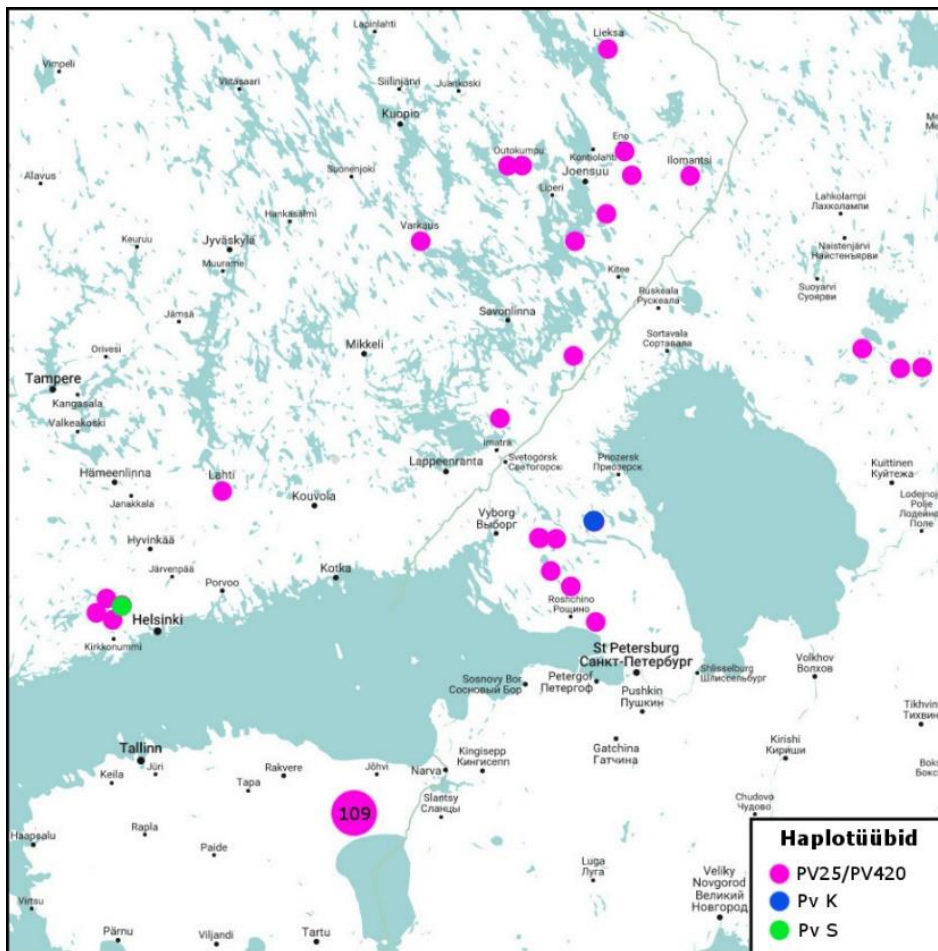
Mitokondriaalseid CytB ja D-ling järjestusi õnnestus amplifitseerida kõikidest Eesti proovidest ning kõikidest Soome proovidest. Karjala proovide puhul õnnestus CytB markeriga tulemus saada 35-st proovist üheksal ning D-ling puhul viiel proovil.

Lendorava geneetilistel uuringutel on mitokondriaalsetest markeritest eelnevalt kasutatud ja enim uuritud CytB täispikka järjestust kui ka CytB fragmente (Lee et al., 2008; Oshida et al., 2005). Nende tööde käigus on uuritud CytB geenis olevaid ühenukleotiidilisi polümorfseid positsioone (SNP- *single nucleotide polymorphism*) ja saadud ühenukleotiidiliste erinevuste järgi määratletud CytB haplotüüpid, mille järgi on lendoravad grupeeritud fülogeneetiliselt kolme gruppi: Põhja-Euraasia (siia kuuluvad alagrupid Loode-Euraasia ja Keskisiber), Kaug-Ida ning Hokkaido Saar (Lee et al., 2008; Oshida et al., 2005).

CytB geen on 1140 aluspaari pikkune ning antud töös võrreldi lendoravate CytB geeni järjestusi vahemikus 580-1039 aluspaari. CytB järjestuste joondamine (Joonis 1.) näitas, et 132 proovi, mille hulka kuulusid nii Eesti, Soome kui ka Karjala proovid, olid eespool nimetatud vahemikus omavahel identsed. Nendel 132 proovil tuvastati SNP positsioonid, võrdluses eelnevalt avaldatud haplotüüp PV16-ga (Lee et al., 2008), kohtadel 801, 834, 852, 917. Võrreldes eelnevalt avaldatud andmetega olid need järjestused vaadeldud vahemikus kõige sarnasemad haplotüüpidega Pv25 ja Pv40. Pv25 ja Pv40 haplotüübid olid eelnevalt identifitseeritud lendoravatelt, kes olid pärit Venemaalt, Kirovi maakonnast. Huvitaval kombel ei nähtud haplotüüpe Pv14, Pv10, Pv09 ja Pv03, mis olid eelnevalt avaldatud andmete kohaselt tuvastatud lendoravatel, kes paiknesid Eestile, Soomele ja Karjalale lähemal kui haplotüübid Pv25 ja Pv40 (Lee et al., 2008; Oshida et al., 2005). Lisaks tuvastati ühest Soome ja ühest Karjala proovist haplotüübid, mida pole eelnevalt avaldatud. Soome proovil esinesid SNP-d lisaks 801, 834, 852, 917 positsioonidele ka 708 positsioonil. Karjala proovil esines lisaks 801, 834, 852, 917 positsioonidele SNP veel positsioonil 987 (Joonis 1.). Leitud haplotüübid on lisaks visualiseeritud proovide päritolu järgi joonisel 2. Eelnevalt avaldatud andmetega võrreldes kuuluvad Soome, Eesti ning Karjala populatsioonidest leitud haplotüübid kõik Põhja-Euraasia gruppi, Loode-Euraasia alagruppi.



Joonis 1. Eesti, Soome ja Karjala lendoravate CytB joondus. Joondus on tehtud haplotüüp PV16 järgi (Lee et al., 2008). Punktid tähistavad PV16 järjestusega võrdlusel identseid nukleotiide ning SNP kohad on välja toodud nukleotiidiliste erinevustega. PV25/PV40 joondus CytB haplotüüpi, mis antud töö käigus 132 proovis tuvastati, ning on identne 580-1039 nukleotiidilises vahemikus eelnevalt avaldatud PV25 ja PV40 haplotüüpidega. Varem mitte avaldatud Karjala ning Soome haplotüübid on tähistatud vastavalt Pv K ja Pv S - mõlemad esines ühes proovis. Järjestuste joonduste lõpus on numbriliselt näidatud mitmes proovis leiti vastav järjestus.



←Joonis 2. Eesti, Soome ja Karjala lendoravate CytB haplotüübid asukoha järgi. Täppidega on märgitud lendoravate asukohad, kellelt proov olid võetud. Soome ja Karjala proovide puhul tähendab iga täpp ühte proovi. Eestist pärit proovide puhul on lisatud tähise peale arv, mis näitab mitu proovi vastab leitud haplotüübile. Kusjuures erinevad haplotüübid on tähistatud erinevate värvidega ning korreleeruvad joonisel 1 välja toodud joonduses esinevate värvidega.

Lisaks SNP-dele vaadeldi ka heteroplasмия esinemist CytB mtDNA järjestuses. Heteroplasмия puhul esineb ühe isendi organismis nii metsiktüüpi kui ka mutantseid mtDNA järjestusi (Stewart and Chinnery, 2015). Heteroplasмия tuvastati ühes Karjala proovis, CytB positsioonil 798. Teistes proovides heteroplasmiat ei leitud.

Üldiselt võib öelda, et CytB markeri puhul ei erinenud Eesti, Soome ja Karjala populatsioonid üksteisest märkimisväärselt. Eesti populatsiooni puhul olid kõik proovid uuritud CytB järjestuse pikkuses geneetiliselt identsed. Soome ja Karjala proovides esines kaks erinevat haplotüüpi. Kui võtta arvesse proovide valimi suuruse erinevused, Eesti 109, Soome 16 ja Karjala 9, ning esinenud haplotüüpe, siis Eesti lendorava populatsioon on CytB markeri järgi homogeensem kui teised populatsioonid.

D-linguks nimetatakse mitokondri kontroll-regiooni, mis ei ole geeni kodeeriv ala, seetõttu tekib sinna alasse ka suurema tõenäosusega mutatsioone (Butler, 2012). Varasemalt on näidatud, et mitokondriaalse DNA (mtDNA) järjestustes esineb enim heteroplasmiat just D-lingu piirkonnas (Payne et al., 2013). Lendoravate D-lingu regiooni kohta pole põhjalikumaid uuringuid tehtud ning seetõttu ei leidu eelnevalt avaldatud D-lingu haplotüüpe.

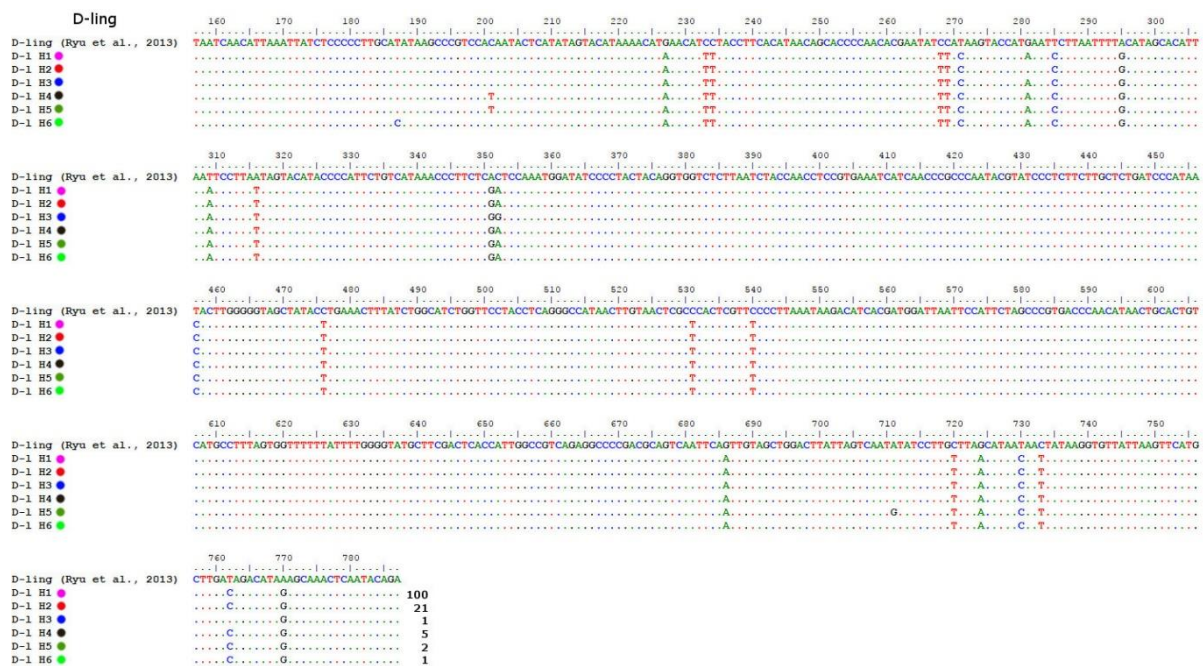
D-lingu regioon on lendoravatel 1066 aluspaari pikkune (Ryu et al., 2013). Antud töös võrreldi D-lingu järjestusi vahemikus 157 – 787 aluspaari. D-lingu järjestuse joondamine (Joonis 3.) tuvastas publitseeritud mtDNA genoomi (Ryu et al., 2013) D-lingu järjestusega võrdlusel kokku 27 erinevat SNP kohta ning 6 erinevat haplotüüpi (Joonis 3.). Haplotüüpide paiknemine kaardil on visualiseeritud joonisel 4 ning SNP kohad on välja toodud joonisel 3. D-ling markeri puhul leidis Eesti, Soome ja Karjala populatsioonide vahel suuremaid erinevusi kui CytB markeri puhul. Eesti populatsioonis esines kaks haplotüüpi: D-I H1 ja D-I H2. Haplotüüp D-I H1 esines ka Soome ja Karjala populatsioonides ning oli kõige arvukamalt esinenud haplotüüp, olles kokku tuvastatud 100 proovis. Teine Eesti proovidest leitud haplotüüp D-I H2 esines ainult Eesti lendoravatel ja see esines 22 proovis. Haplotüüp D-I H3 leiti ühel korral Soome populatsioonist. Haplotüüp D-I H4 esines viiel korral ning seda leiti ühest Karjala proovist ning neljast Soome proovist. Haplotüüp D-I H5 leiti kahel korral Soome populatsioonist ning haplotüüp D-I H6 ühel korral Karjala proovidest. Haplotüüpide esinemine populatsioonides on välja toodud tabelis 1.

Karjalast pärit 5 proovi põhjal saab järeldada, et Karjala populatsioon on sarnasem Soome populatsiooniga. Kõige mitmekesisem oli Soome populatsioon, kuna 16 analüüsitud proovi hulgast leiti 4 erinevat haplotüüpi. Karjala 5 proovi hulgas oli esindatud 3 erinevat haplotüüpi. Eesti 109 proovi hulgast leiti aga 2 erinevat haplotüüpi, mis tähendab, et Eesti populatsioon oli D-ling järjestuse põhjal kõikidest populatsioonidest kõige väiksema mitmekesisusega.

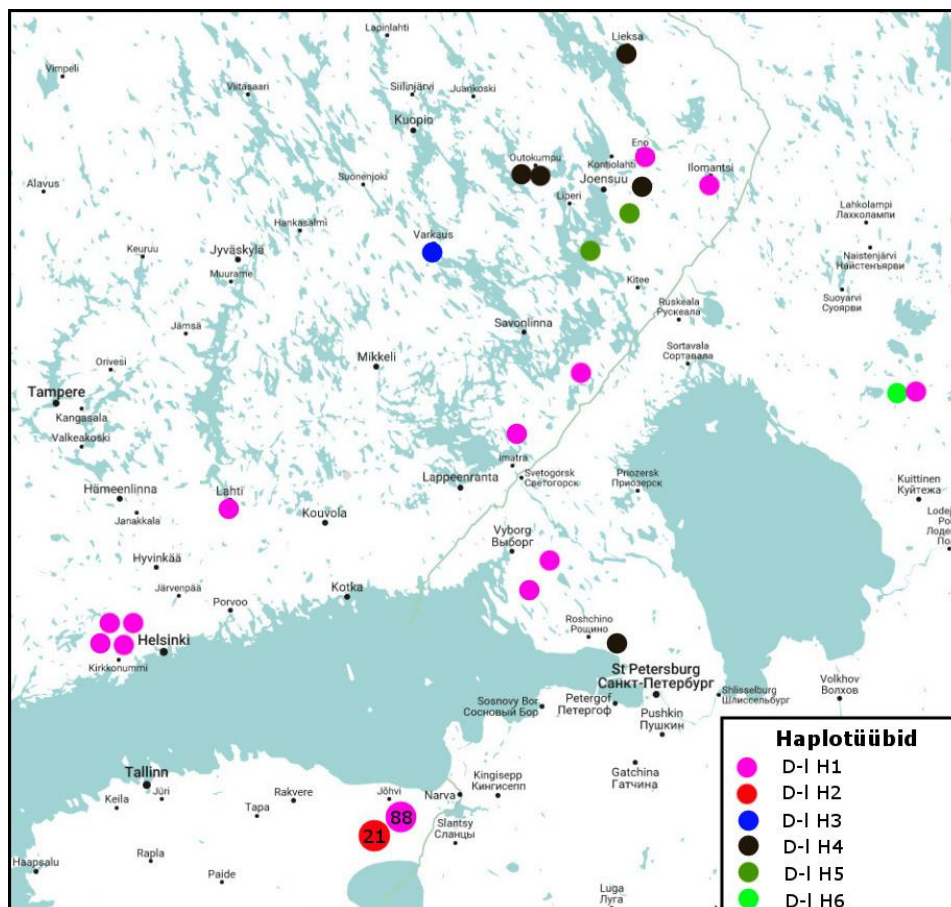
Populatsioon	Haplotüübid ja nende esinemise arv populatsioonides					
	D-I H1	D-I H2	D-I H3	D-I H4	D-I H5	D-I H6
Eesti	88	21	-	-	-	-
Soome	9	-	1	4	2	-
Karjala	3	-	-	1	-	1
Kokku	100	21	1	5	2	1

Tabel 1. D-lingu erinevate haplotüüpide esinemise arv Eesti, Soome ja Karjala lendorava populatsioonides. – tähistab esinemise puudumist.

Seitsmes Eesti proovis tuvastati ühekordne heteroplasma D-lingu kolmes erinevas positsioonis – 254, 177 ja 281. Karjala kahes proovis leiti 5 erinevat heteroplasma positsiooni, kusjuures ühes proovis oli 2-3 heteroplasmiat. Karjala proovides esinenud heteroplasmiad paiknesid D-lingu järjestuses järgmistes positsioonides: 263, 350, 507, 578 ja 726. Soome proovide puhul leiti ühes proovis neljal positsioonil paiknevad heteroplasmiad – 244, 298, 456, 644. Eesti, Soome ja Karjala lendorava populatsioonide D-lingu heteroplasmiate positsioonid erinesid üksteisest.

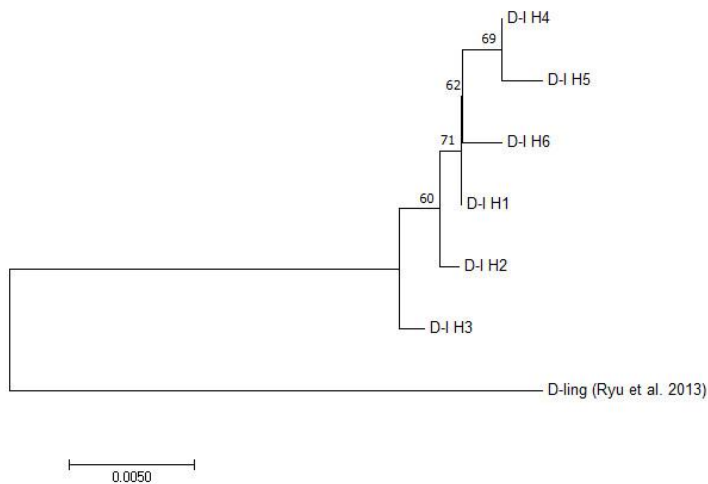


Joonis 3. Eesti, Soome ja Karjala lendoravate D-lingu joondus. Joondus on tehtud eelnevalt publitseeritud mitokondriaalse genoomi D-lingu järjestusega (Ryu et al., 2013). Punktid tähistavad publitseeritud D-ling järjestusega võrdlusel identseid nukleotiide ning SNP kohad on välja toodud nukleotiidiliste erinevustega. Järjestuste joonduste lõpus on numbriliselt näidatud mitmes proovis leiti vastav järjestus.



←Joonis 4. Eesti, Soome ja Karjala lendoravate D-lingu haplotüübid asukoha järgi. Täppidega on märgitud lendoravate asukohad, kellelt proov olid võetud. Soome ja Karjala proovide puhul tähendab iga täpp ühte proovi. Eestist pärit proovide puhul on lisatud tähise peale arv, mis näitab mitu proovi vastab leitud haplotüübile. Kusjuures erinevad haplotüübid on tähistatud erinevate värvidega ning korreleeruvad joonisel 3. välja toodud joonduses esinevate värvidega.

Lisaks võrreldi leitud D-lingu haplotüüpide järjestusi fülogeneetiliselt (Joonis 5.) ning leiti, et Eesti lendoravatel esinevad kaks haplotüüpi D-I H1 ja D-I H2 grupeeruvad üksteisele lähedale. Samuti grupeerivad lähestikku D-I H5 ja D-I H4, mis leiti vaid Soome lendoravatel ning kaardilt on näha (Joonis 4), et nende haplotüüpidega lendoravad paiknevad üksteisele lähedal.



Joonis 5. Lendorava D-lingu erinevate haplotüüpide fülogeneetiline puu. Puul on välja toodud kõik selle töö käigus leitud 6 D-lingu haplotüüpi, lisaks on puul võrdluses avaldatud mitokondriaalse genoomi D-lingu järjestus. Kõige sagedamini, ja kõikides populatsioonides, esines D-I H1 haplotüüp ning ta grupeerub lähedale D-I H2 ning D-I H6 haplotüüpidega.

3.3 Tuumsed markerid

Tuumsete markeritega ei õnnestunud tulemusi saada Karjalast pärit proovide puhul. Põhjused on välja toodud peatükis „3.1 Proovide kvaliteet“. Seetõttu on välja toodud tuumsete markeritega võrdlus Eesti ja Soome populatsioonide vahel.

Lendorava tuumsed ehk mikrosatelliitsed markerid on eelnevalt kirjeldatud 2004. aastal (Painter et al., 2004), millest antud tööks kasutati Pvol1, Pvol10, Pvol41, Pvol74, PvolE1, PvolE5, PvolE6 ning PvolE10. Esmakordselt kasutati väljaheiteproovide analüüsil nimetatud markeritest kolme (Pvol41, Pvol74, PvolE1) 2016 aastal kaitstud magistritöös (Kuningas, 2016). Magistritööle eelnevalt oli tuumseid markereid kasutatud ainult koeproovide analüüsil. Käesoleva töö käigus selgus, et (Painter et al., 2004) artikliks kirjeldatud markerite mikrosatelliitide kordusmotiivid ei lähe kokku NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*) andmebaasis olevate nende endi poolt üles pandud markerite järjestustega. Kaheksast markerist kolmel vastab andmebaasis olev järjestus artiklis kirjeldatule. Samuti ei

olnud reprodutseeritavad artiklis (Painter et al., 2004) avaldatud reaktsioonitingimused, ning neid pidi antud töö käigus optimiseerima. Kusjuures, sama probleem oli ka eelpool nimetatud magistritöös. Tuumsete markerite optimiseerimine oli töömahukas ja sellele kulus algselt plaanitust rohkem vahendeid. Raskendavaks asjaoluks võis olla ka markerite mittesobilikus väljaheiteproovide jaoks kuna täheldati, et koeproovide puhul õnnestus tulemuste saamine paremini. Antud töös leiti, et marker Pvol 1 ei sobi edaspidi väljaheiteproovide analüüsiks, kuna selle markeriga ebaõnnestus suuremosa proovidest tulemus saada. Järgevalt on välja toodud tuumsete markeritega analüüsi õnnestumise protsendid Eesti ja Soome kõikide proovide puhul kokku:

- Pvol1 – 7 %
- Pvol10 – 94 %
- Pvol41 – 61,5 %
- Pvol71 – 72,6 %
- PvolE1 – 79,5 %
- PvolE5 – 83,8 %
- PvolE6 – 63,2 %
- PvolE10 – 42,7 %

Eesti ja Soome lendoravate geneetilise mitmekesisuse hindamiseks tuumsete markeritega leiti esmalt allaeelide pikkused, alleelide arvud populatsioonides, arvutati tegelik heterosügootsus (H_{obs}), alleelide sageduste järgi leiti arvutatud heterosügootsus (H_{exp}) ning inbriidingu koefitsient (F) (Tabel 2). Heterosügootsus populatsioonis näitab geneetilist mitmekesisust ning selle väärtus varieerub nullist üheni, kusjuures mida lähemal väärtusele 1, seda heterosügootsem ning seega ka geneetiliselt mitmekesisem on populatsioon (Gillespie, 2004). Inbriidingukoefitsient (F) näitab, kas heterosügootsus on vähenenud, ning väljendab tõenäosust, et pärandunud alleelid on pärit ühiselt eelaselt. Kui $F < 0$ siis inbriiding puudub, kui $F > 0$ siis esineb populatsioonis inbriiding (Hartl and Clark, 2007).

Marker	Populatsioonid	Alleelide arv	Alleelide pikkused (bp)	H_{obs}	H_{exp}	F
Pvol10	Eesti	11	111-145	0.670	0.804	0.167
	Soome	7	123-137	0.750	0.816	0.081
	Kokku	12	111-145	0.682	0.821	0.170
Pvol41	Eesti	11	114-136	0.544	0.707	0.230
	Soome	7	120-136	0.800	0.778	-0.029
	Kokku	11	114-136	0.597	0.758	0.213
Pvol74	Eesti	17	160-198	0.826	0.894	0.076
	Soome	7	152-178	0.813	0.768	-0.059
	Kokku	18	152-198	0.824	0.883	0.068
PvolE1	Eesti	18	296-334	0.535	0.861	0.378
	Soome	11	304-324	0.688	0.842	0.183
	Kokku	19	296-334	0.570	0.873	0.347
PvolE5	Eesti	12	151-175	0.405	0.534	0.241
	Soome	7	157-179	1.000	0.747	-0.338
	Kokku	14	151-179	0.480	0.618	0.224
PvolE6	Eesti	15	168-210	0.525	0.769	0.318
	Soome	6	190-204	0.308	0.396	0.224
	Kokku	16	168-210	0.514	0.751	0.317
PvolE10	Eesti	4	130-136	0.111	0.527	0.789
	Soome	6	130-140	0.571	0.529	-0.079
	Kokku	6	130-140	0.240	0.572	0.581

Tabel 2. Tuumsete markeritega leitud Soome ja Eesti lendoravate alleelide arvud, alleelide pikkused aluspaarides (bp-base pair), tegelik heterosügootsus (H_{obs}), arvutatud heterosügootsus (H_{exp}) ning inbriidingu koefitsient (F).

Alleelide arvu poolest leidis Eesti lendorava populatsioonis kuue markeri korral (Pvol10, Pvol41, Pvol74, PvolE1, PvolE5, PvolE6) rohkem alleele, kui Soome populatsioonis. PvolE10 markeri puhul oli Soome populatsioonis leitud alleelide arv suurem. Leitud alleelide arvu vahe võib tuleneda sellest, et Eesti populatsioonis oli analüüsitud isendeid rohkem kui Soome populatsioonis. Tegelik heterosügootsus (H_{obs}) oli Eesti populatsioonis Soome omast madalam viie markeri puhul – Pvol10, Pvol41, PvolE1, PvolE5 ja PvolE10. Kahe markeri puhul, Pvol74 ja PvolE6 korral, oli H_{obs} väärtus Soome populatsioonis madalam kui Eesti omas. H_{obs} keskmine väärtus kõikide markerite puhul kokku oli Eesti populatsioonis 0.517 ning Soome populatsioonis 0.704. See viitab sellele, et Eesti populatsioonis on geneetiline mitmekesisus madalam võrreldes Soome populatsiooniga. Kuigi tuleb arvesse võtta ka seda, et Eesti proovid on korjatud väiksemalt alalt ning Soome lendorava proovid on kogutud läbi mitme aasta ning populatsioonis käsitletud oravad paiknevad omavahel üksteisest kaugemal kui Eesti lendoravad.

Arvutatud heterosügootsuse puhul (H_{exp}) olid Pvol10, Pvol41, PvolE5 ja PvolE10 markerite puhul Eesti populatsioonis saadud väärtused madalamad kui Soome populatsioonis. PvolE1, Pvol74 ja PvolE6 puhul olid Eesti populatsioonis saadud väärtused kõrgemad kui Soome populatsioonis saadud väärtustest.

Inbriidingukoefitsendi (F) väärtus näitas, et Soome populatsioonis oli 4 markeri puhul $F < 0$, samas kui Eesti populatsioonis olid kõikide markerite puhul kõik väärtused positiivsed. See viitab sellele, et Eesti populatsioonis esineb inbriidingut. Lisaks arvutati veel F -statistiku väärtused, hindamaks heterosügootsuse vähenemist alampopulatsioonides (F_{IS}). Väärtused leiti kahe hinnangu alusel, Weir ja Cockerhami (1984) ning Robertson ja Hill (1984), mis näitasid sama tendentsi nagu F (pole tabelisse välja toodud). Saadud F_{IS} väärtused viitasid samuti inbriidingu esinemisele ning sellele, et Eesti populatsioon on geneetiliselt vähem mitmekesisem kui Soome oma.

Saadud inbriidingu koefitsiendi ja F_{IS} väärtustel põhinev järeldus, et Eesti populatsioon on vähem mitmekesisem, toetab ka heterosügootsuse defitsiidi (*heterozygote deficiency*) kontrolliks tehtud Hardy-Weinbergi U test (Tabel 3). Hardy-Weinbergi teoreemi kohaselt püsivalt vabalt ristuv populatsioonis alleeli ja genotüübisagedused muutumata juhul kui ei toimu mutatsioone, migratsiooni ja populatsiooni suurus on piisavalt suur. U- test näitab heterosügootsuse defitsiidi esinemise tõenäosust ning kõrvalekallet Hardy-Weinbergi seadusest. U-testi kohaselt esineb Eesti lendoravatel heterosügootsuse defitsiit ning saadud väärtus on statistiliselt oluline (Tabel 3).

Populatsioon	P-väärtus (U-test)	Standard viga
Eesti	0.00001*	0.00001
Soome	0.0893	0.0083

Tabel 3. Genepop on the Web programmiga saadud U-testi P-väärtuse tulemused. * P- väärtus Eesti populatsiooni puhul statistiliselt oluline ehk $P \leq 0.0001$

4. Ülegenoomse sekveneermise võimalikus

Lisaks populatsioonigeneetilisele analüüsile uuriti võimalust sekveneerida lendorava kogu genoom. Selleks on vajalik väga hea kvaliteediga koematerjal, millest eraldada kõrge kvaliteediga ja piisavas koguses DNA. Lendorava genoomi sekveneermiseks vajalik algmaterjal on olemas Tallinna loomaia liigikaitselaboris. Algmaterjal pärineb Eesti populatsioonist.

Harilikul lendoraval (*Pteromys volans*) on sekveneeritud mitokondriaalne genoom, mis on 16 513 aluspaari suurune (Ryu et al., 2013). Tuumset genoomi pole seni sekveneeritud. Küll aga on uuritud hariliku lendorava kromosoomi ning näidatud, et harilikul lendoraval on 38 diploidset kromosoomi (Oshida et al., 2000). Inimesel on diploidsete kromosoomide arv 46 (Tjio, 1978) ning inimese haploidne genoom on ligikaudu 3,2 Gb ehk 3 200 000 000 aluspaari suurune (Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Kromosoomide arvu põhjal peaks lendorava haploidne genoom olema 1,3 korda inimese omast väiksem ehk ligikaudu 2,5 Gb suurune ehk 2 500 000 000 aluspaari suurune.

Genoomi sekveneermise koguhind sõltub mitmest tegurist. Nendeks teguriteks on sekveneeritava genoomi suurus, sekveneermisplatvormi valik ning infohulk ehk kui palju soovitakse saada sekveneermisel saadud andmeid. Lisaks järgneb sellele veel sekveneermisandmete bioinformaatiline analüüs, mille hind ja ajakulu antud töö eelarvesse ei mahuks ja seetõttu ei kajastu see rohkem järgnevas arutelus. Küll aga peab mainima, et sekveneermistulemuste kokkupaneku teeb aega nõudvaks andmete interpreteerimine kuna tegemist oleks *de novo* analüüsiga, mis tähendab seda, et puudub võrdlusmaterjal.

Sekveneermisplatvormi valik ning hind sõltub pakkujast. Selle juures on oluline kattuvus ehk sekveneermise sügavus, mis iseloomustab lugemite arvu konkreetse DNA piirkonna analüüsimise tulemuslikkuse kohta. Väiksema kattuvuse korral võivad genoomi sekveneermisel järjestusse jääda lüngad ning kattuvuse valikust sõltubki otseselt lünkade arv.

Lendorava *de novo* genoomi sekveneermise võimalikkuse uurimiseks küsiti/saadi hinnapakumised seitsmelt asutuselt. Nendeks olid: Geenivaramu (Eesti), Eesti Biokeskus

(Eesti), BaseClear (Holland), Fasteris (Šveits), Uppsala Ülikool (Rootsi), Helsingi Ülikool (Soome) ning GATC Biotech (Saksamaa). Pakuti Illumina (kasutades erinevaid sekvenaatorid) ja PacBio sekveneerimisplatforme. Hinnad varieerusid alates 6400 eurost kuni 59 000 euroni. Hinnapäringu järgselt selgus, et selle projekti raames ei ole piisavalt rahalisi vahendeid sekveneerimaks lendorava genoom. Sellele vaatamata täideti eesmärk uurida *de novo* genoomi sekveneerimise võimalikkust ja jätkuvad potentsiaalsete koostööpartnerite otsingud leidmaks võimalusi lendorava genoomi sekveneerimiseks.

5. Kokkuvõte

Töös analüüsitud proovide koguarv oli 160 proovi, mis ületas hankes välja toodud maksimaalse 130 proovi nõude. Eesti lendoravate väljaheiteproovid olid hea kvaliteediga ja vastasid DNA eralduseks vajalikele nõuetele, samuti olid hea kvaliteediga nii Soomest pärit koe- kui ka väljaheiteproovid. Karjalast pärit proovid ei vastanud kvaliteedi ja kvantiteedi nõuetele. Seetõttu õnnestus Karjala proovidest saada tulemus ainult mitokondriaalsete markeritega.

Järgnevalt on välja toodud hankes kirjeldatud ülesanded ja antud töö raames saadud vastused¹:

1. Selgitada, kas lendorava Eesti ja Soome ning Karjala populatsioonid erinevad üksteisest geneetiliselt oluliselt

Mitokondriaalse markeri CytB puhul ei erinenud Eesti, Soome ja Karjala populatsioonid üksteisest märkimisväärselt. Teise mitokondriaalse markeri, D-ling, analüüsil leidus Eesti, Soome ja Karjala populatsioonide vahel suuremaid erinevusi kui CytB markeri puhul. Eelnevalt avaldatud andmetega võrreldes kuuluvad Soome, Eesti ning Karjala populatsioonidest leitud CytB haplotüübid kõik Põhja-Euraasia gruppi, Loode-Euraasia alagruppi. Samuti leiti D-ling markeriga ühiseid haplotüüpe kõikidest populatsioonidest. Seega ei erine geneetiliselt Eesti, Soome ning Karjala populatsioonid üksteisest oluliselt.

2. Selgitada, kui suur on lendorava populatsiooni geneetiline mitmekesisus Eestis ning võrrelda seda Soome ja Karjala andmetega

Eesti lendorava populatsioon oli CytB markeri järgi homogensem kui teised populatsioonid. D-ling järjestuse põhjal oli Eesti populatsioon teistest kõige väiksema mitmekesisusega. Samuti leiti, et Eesti populatsioonis esineb inbriidingut. Tuumsete markerite puhul leiti, et Eesti populatsioonis on geneetiline mitmekesisus madalam võrreldes Soome

¹ **NB Järgnev kokkuvõte põhineb üksnes esitatud proovide tulemuslikul analüüsil ja interpreteerimisel**

populatsiooniga. Samuti tuvastati Eesti lendoravatel heterosügootsuse defitsiit ning saadud väärtus oli statistiliselt oluline.

3. Testida ülegenoomse sekveneerimise võimalikkust kolmest populatsioonist pärit isendite alusel

a. Leiti lendorava genoomi sekveneerimiseks vajalik kvaliteetne algmaterjal ja see on ladustatud Tallinna loomaia liigikaitaselaboris tulevaste uuringute tarbeks.

b. Uuriti genoomi sekveneerimiseks vajaminevaid kulusi. Kuna sekveneerimise maksumus sõltub sekveneeritava genoomi suurusest, sekveneerimisplatvormi valikust ning saadavast infohulga suurusest ehk kattuvusest, siis hinnati lendorava genoomi võimalikku suurust. Kromosoomide arvu põhjal leiti, et lendorava haploidne genoom peaks olema 1,3 korda inimese omast väiksem ehk ligikaudu 2,5 Gb suurune (2 500 000 000 aluspaari suurune).

c. Sekveneerimise maksumusest selguse saamiseks saadeti hinnapäringuid *de novo* sekveneerimisteenust pakkuvatele asutustele. Hinnapakumine saadi erinevatele sekveneerimisplatvormidele seitsmelt asutuselt, nii Eestist kui ka välismaalt. Pakutav hinnavahe ulatus 6400 eurost kuni 59 000 euroni. Kuna eesmärgiks oli testida ülegenoomse sekveneerimise võimalikkust siis uuringu tulemus andis vastuse, et antud projekti raames see ei ole võimalik. Seda seetõttu, et pakkujate soovitud rahaliste vahendite kulu töö teostamiseks ei vasta käesoleva projekti võimalustele. Seega peaks sekveneerimist teostama tulevikus. Sellele vaatamata astuti esimesed olulised sammud, et see tulevikus võimalik oleks.

d. Selleks, et optimeerida genoomi sekveneerimisega seotud kulusid tulevikus võeti ühendust USA mustjalg-tuhkru taastamise projekti juhi dr. Paul Marinariga Looduskaitsebioloogia Instituudist (Smithonian Institution). Sellel projektil on kogemus mustjalg-tuhkru genoomi sekveneerimises ning huvi seda teostada ka teiste liikide osas. Mustjalg-tuhkru genoomi uurija dr. Klaus-Peter Koepli külastab Tallinna Loomaaeda augustis eesmärgiga arutada koostööd SA Lutreola ja Loomaia laboriga naaritsa genoomi sekveneerimise osas. Sellel koosolekul on plaanitud arutada ka lendorava genoomi sekveneerimise osas koostöö alustamise võimalusi.

Kokkuvõtvalt, koguti käesoleva projekti raames genoomi sekveneerimiseks vajalik alusmaterjal, selgitati võimalused tulevase sekveneerimise reaalseks teostamiseks. Lisaks astuti ka esimesi samme koostöö edendamiseks selle töö edukaks läbiviimiseks lähitulevikus.

Soovitused

1. Edaspidisteks lendorava genoomi **uuringuteks on hädavajalik lendorava kogu genoomi sekveneerimine**. Seda eriti järgmisel põhjusel. Antud töö käigus selgus, et varem avaldatud tuumsete markerite puhul (Painter et al., 2004) ilmnesid ebakõlad eelnevate tulemuste kordamisel. Nimelt ei vastanud märgitud artiklis avaldatud tuumsete markerite mikrosatelliitide kordusjärjestused andmebaasis leiduvatele järjestustele. Lisaks ei olnud artiklis avaldatud reaktsioonitingimused korratavad, mille tõttu tuli lisaks optimeerida markerite amplifitseerimiseks mõeldud reaktsioonitingimusi. Kahjuks ei ole rohkem hariliku lendorava tuumseid markereid meile teadaolevalt uuritud ega uuringutulemusi avaldatud. Nende kitsaskohtade ületamiseks, ja edasise lendorava kaitse geneetilise poole edukaks korraldamiseks, tuleb järgnevate tegevuste käigus kindlasti sekveneerida lendorava genoom.
2. Lendorava genoomi sekveneerimine loob võimaluse leida kasutamiseks suurema hulga informatiivseid tuumseid markereid, sealhulgas Y kromosoomi markereid. Viimaste kohta senini vajalik informatsioon puudub. **Uute tuumsete markerite kasutusele võtmine võimaldaks viia geneetilised uuringud indiviidi tasemeni, mis omakorda võimaldaks molekulaarsete vahendite rakendamisega viia Eesti lendorava seire populatsiooni bioloogilisele tasemele.**
3. Eesti lendorava populatsioon on antud uuringu, ja kasutatud markerite kohaselt geneetiliselt küllaltki homogeenne. Lisaks leiti, et Eesti lendoravatel esineb heterosügootsuse defitsiit ning leiti ka inbriidingut. **Seetõttu võiks tulevikus kaaluda lendoravate tugiasustamist Soomest Eestisse. Sellele peaks aga kindlasti eelnema Eesti ja Soome lendoravate katseline ristamine, et vältida märkamatu riski. Katselist ristamist võiks teosta tehistingimustes. Otsuste tegemine selles küsimuse võiks jääda sinna aega, kus genoomi sekveneerimine on pakkunud võimalusi lisauuringuteks ning populatsioonide erinevuste veelgi täpsemaks kaardistamiseks. Ettevaatusprintsipiibist lähtuvalt võiks esialgu kaaluda vaid ümberasustamist uute**

populatsioonide loomiseks ning kasutada selleks eelkõige loomi Soome lõuna osast.

4. Eelnevalt avaldatud andmetega võrreldes kuuluvad Soome, Eesti ning Karjala populatsioonidest leitud CytB haplotüübid kõik ühte Põhja-Euraasia gruppi, Loode-Euraasia alagruppi. Samuti leiti D-ling markeriga ühiseid haplotüüpe kõikidest populatsioonidest. Käesolevas töös uuritud mitokondriaalsete CytB kui ka D-lingu järjestuste põhjal võib väita, et Eesti, Soome ja Karjala lendoravad on geneetiliselt piisavalt sarnased, et käsitleda neid ühtse *management unit*-ina. **Seetõttu ei saa, olemasolevate andmete põhjal, pidada tugiasutamist Soomest Eestisse lendorava kohalikule populatsioonile geneetilises mõttes ohtu kujutavaks tegevuseks.**
5. Tugiasustamise seisukohalt oleks oluline, lisaks looduses olevale populatsioonile, testida ka lähiümbruskonna loomaaedades paiknevaid lendoravaid. Näiteks on olemas Riia loomaaias lendoravad, kelle võiks kaasata edaspidistesse uuringutesse, et uurida välja millisesse populatsiooni nad võiksid kuuluda.

6. Kasutatud kirjandus

- Butler, J.M., 2012. Advanced topics in forensic DNA typing: methodology.
- Deuter, R., Pietsch, S., Hertel, S., Müller, O., 1995. A method for preparation of fecal DNA suitable for PCR. *Nucleic Acids Res.* 23, 3800–3801.
- Gillespie, J.H., 2004. Population genetics: a concise guide, 2nd ed. ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41, 95–98.
- Hartl, D.L., Clark, A.G., 2007. Principles of population genetics, 4th ed. ed. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Human Genome Sequencing Consortium, I., 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931–945. doi:10.1038/nature03001
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. doi:10.1093/molbev/msw054
- Kuningas, K., 2016. Eesti ja Soome lendorava (*Pteromys volans*) populatsioonide geneetilise mitmekesisuse hindamine (magistritöö). Tallinna Tehnikaülikool.
- Lee, Mu-Yeong, Park, S., Hong, Y., Kim, Y., Voloshina, I., Myslenkov, A., Saveljev, A.P., Choi, T., Piao, R., An, J., Lee, Mun-Han, Lee, H., Min, M., 2008. Mitochondrial genetic diversity and phylogenetic relationships of Siberian flying squirrel (*Pteromys volans*) populations. *Anim. Cells Syst.* 12, 269–277. doi:10.1080/19768354.2008.9647182
- Oshida, T., Abramov, A., Yanagawa, H., Masuda, R., 2005. Phylogeography of the Russian flying squirrel (*Pteromys volans*): implication of refugia theory in arboreal small mammal of Eurasia: PHYLOGEOGRAPHY OF PTEROMYS VOLANS. *Mol. Ecol.* 14, 1191–1196. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02475.x
- Oshida, T., Yanagawa, H., Tsuda, M., Indue, S., Yoshida, M.C., 2000. Comparisons of the banded karyotypes between the small Japanese flying squirrel, *Pteromys momonga* and the Russian flying squirrel, *P. volans* (Rodentia, Sciuridae). *Caryologia* 53, 133–140. doi:10.1080/00087114.2000.10589188
- Painter, J.N., Selonen, V., Hanski, I.K., 2004. Microsatellite loci for the Siberian flying squirrel, *Pteromys volans*: PRIMER NOTE. *Mol. Ecol. Notes* 4, 119–121. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00588.x
- Payne, B.A.I., Wilson, I.J., Yu-Wai-Man, P., Coxhead, J., Deehan, D., Horvath, R., Taylor, R.W., Samuels, D.C., Santibanez-Koref, M., Chinnery, P.F., 2013. Universal heteroplasmy of human mitochondrial DNA. *Hum. Mol. Genet.* 22, 384–390. doi:10.1093/hmg/ddt435
- Rousset, F., 2008. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 103–106. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x
- Ryu, S.H., Kwak, M.J., Hwang, U.W., 2013. Complete mitochondrial genome of the Eurasian flying squirrel *Pteromys volans* (Sciuromorpha, Sciuridae) and revision of rodent phylogeny. *Mol. Biol. Rep.* 40, 1917–1926. doi:10.1007/s11033-012-2248-x
- Satoh, M., Kuroiwa, T., 1991. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp. Cell Res.* 196, 137–140.
- Stewart, J.B., Chinnery, P.F., 2015. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat. Rev. Genet.* 16, 530–542. doi:10.1038/nrg3966
- Tjio, J.H., 1978. The chromosome number of man. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 130, 723–724.