

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

GRETA BARZINSKAITĖ

**Viešvilės rezervate auginamų kurtinių ir Belovežo girios kurtinių
populiacijos genetinės įvairovės palyginimas naudojant mikrosatelitinius ir
mitochondrinės DNR žymenis**

Magistro baigiamasis darbas

Genetikos studijų programa

Darbo vadovas

Dr. (HP) Dalius Butkauskas

Vilnius 2024

TURINYS

| | |
|---|----|
| SANTRUMPOS..... | 3 |
| SANTRAUKA..... | 4 |
| SUMMARY..... | 5 |
| ĮVADAS | 6 |
| 1. LITERATŪROS APŽVALGA..... | 7 |
| 1.1. Kurtinys (<i>Tetrao urogallus</i>)..... | 7 |
| 1.2 Populiacijų genetinė įvairovė..... | 9 |
| 1.3 DNR mikrosatelitiniai žymenys..... | 10 |
| 1.4 Mitochondrinės DNR žymenys | 11 |
| 2. MEDŽIAGOS IR METODAI | 13 |
| 2.1. Kurtinių mėginiai | 13 |
| 2.2 Ekspermentinė dalis | 13 |
| 2.2.1 DNR skyrimas..... | 13 |
| 2.2.2 Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) | 14 |
| 2.3 Duomenų analizė | 17 |
| 3. REZULTATAI..... | 18 |
| 3.1 Lietuvos ir Baltarusijos kurtinių DNR mikrosatelitinių žymenų genotipavimo rezultatai . | 18 |
| 3.2 Lietuvos ir Baltarusijos kurtinių mtDNR D-kilpos sekų analizės rezultatai | 23 |
| REZULTATŲ APTARIMAS | 26 |
| IŠVADOS | 28 |
| ASMENINIO INDĖLIO APRAŠYMAS | 29 |
| PADĖKA | 30 |
| LITERATŪROS SĄRAŠAS | 31 |

SANTRUMPOS

mtDNR – mitochondrinė DNR

PGR – polimerazinė grandininė reakcija (angl. *polymerase chain reaction, PCR*)

EDTA – etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druska (angl. *Ethylenediaminetetraacetic acid*)

SDS – natrio dodecilsulfatas

VU – pažeidžiama rūšis (angl. *vulnerable species*)

SSR – paprasti sekos pasikartojimai (angl. *simple sequence repeats*)

STR – trumpi tandemų pasikartojimai (angl. *short tandem repeats.*)

SSLP – paprastos sekos ilgio polimorfizmai (angl. *simple sequence length polymorphisms*)

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Greta Barzinskaitė

**Viešvilės rezervate auginamų kurtinių ir Belovežo girios kurtinių populiacijos genetinės įvairovės
palyginimas naudojant mikrosatelitinius ir mitochondrinės DNR žymenis**

Magistro baigiamasis darbas

SANTRAUKA

Nykstant miškams, nyksta ir laukinių gyvūnų namai, o kartu ir patys gyvūnai. Fragmentacija ir gyvenamosios aplinkos praradimas yra viena iš didžiausių grėsmių biologinei įvairovei visame pasaulyje. Kurtiniai yra laikomi indikatorine rūšimi, rodančia didelę biologinę įvairovę miškuose. Šios paukščių rūšies aptinkamumas siejamas su laukinių gyvūnų gausa miško buveinėje, žinduolių bei skirtingų paukščių rūšių įvairove. Todėl apsaugos strategijos, skiriamos kurtiniams išsaugoti, gali turėti teigiamą poveikį ne tik kurtiniams, bet ir kitų miško rūšių išlikimui.

Baigiamojo darbo metu buvo siekiama įvertinti Lietuvoje (Viešvilės kurtinių veislyne) auginamų ir Baltarusijoje (Belovežo girioje gyvenančių) kurtinių populiacijų genetinę įvairovę. Naudojant Gamtos tyrimų centre, Molekulinės ekologijos laboratorijoje sukurtus TetrF ir TetrR pradmenis, buvo pagausinti tiriamųjų individų mtDNR D-kilpos regiono fragmentai bei nustatytos jų DNR sekos, identifikuoti 5 skirtingi haplotipai. Genotipuojant kurtinių individus naudojant mikrosatelitinius žymenis pastebėta, kad tam tikri aleliai yra dažnesni: 204 TUT1, 158 TUT2, 156 TUT3, 165 TUT4 ir 196 BG18 yra dažnesni Baltarusijos kurtinių populiacijoje. Priešingai, 160 TUT2, 152 TUT3 ir 169 TUT4 yra dažnesni Lietuvos kurtinių populiacijoje. Atliktų tyrimų metu buvo pastebėta, kad nors tiriamų Lietuvos ir Baltarusijos kurtinių populiacijų atstovai yra genetiškai artimi vieni kitiems, laukinėje gamtoje augančių Baltarusijos kurtinių genetinė įvairovė yra didesnė, ypač remiantis mtDNR sekų rezultatų analize.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Greta Barzinskaitė

**Comparison of Genetic Diversity of Capercaillie Population Raised in Viešvilė Reserve with
Capercaillie Population in Białowieża Forest Using Microsatellite and Mitochondrial DNA
Markers**

Master thesis

SUMMARY

As forests disappear, so do the homes of wild animals, and consequently, the animals themselves. Fragmentation and habitat loss are among the greatest threats to biodiversity worldwide. Capercaillies are considered an indicator species, signifying high biodiversity in forests. This bird species is associated with a wealth of wildlife, including forest mammals and various bird species. Therefore, conservation strategies aimed at preserving capercaillies can have a positive impact not only on the capercaillies themselves but also on the survival of other forest species.

The aim of this thesis was to assess the genetic diversity of the capercaillie populations in Lithuania (Capercaillie Population Raised in Viešvilė Reserve) and Belarus (Capercaillie Population in Białowieża Forest). Using TetrF and TetrR primers developed at the Nature Research Centre's Molecular Ecology Laboratory, five haplotypes of the mtDNA D-loop among the studied individuals were identified. Genotyping of capercaillie individuals using microsatellite markers revealed that certain alleles are more common: 204 TUT1, 158 TUT2, 156 TUT3, 165 TUT4, and 196 BG18 are more frequent in the Belarusian capercaillie population. Conversely, 160 TUT2, 152 TUT3, and 169 TUT4 are more frequent in the Lithuanian capercaillie population. The study found that although the studied representatives of Lithuanian and Belarusian capercaillie populations are genetically similar, the wild capercaillies in Belarus exhibit greater genetic diversity according to the analysis of mtDNA sequence results.

ĮVADAS

Kurtinys (*Tetrao urogallus*) pasauliniu mastu nėra laikomas nykstančia rūšimi, tačiau daugumoje Europos vietų situacija yra skirtinga. Šie paukščiai yra išnykę Airijoje, reintrodukuoti Didžiojoje Britanijoje, ir daugelyje Europos šalių įtraukti į raudonąsias knygas. Lietuvoje, remiantis 2015 metų BirdLife International (2015) European Red List of Birds duomenimis, buvo suskaičiuota tarp 300 ir 400 kurtinių. Viešvilės rezervatas yra vienintelė kurtinių veisykla Lietuvoje, skirta šios rūšies populiacijos atkūrimui laukinėje gamtoje. Todėl Lietuvoje veisiamų kurtinių genetiniai tyrimai yra itin svarbūs, nes jie padeda kurti efektyvias šios rūšies apsaugos strategijas.

Kurtiniai paprastai yra sėslūs ir baikštūs paukščiai, vengiantys kontakto su žmonėmis. Didžiąją laiko dalį jie praleidžia ieškodami maisto ant žemės arba medžiuose. Šie paukščiai yra paplitę nuo vakarų Europos kalnų iki centrinės ir rytų Europos, Skandinavijos, Rusijos bei Sibiro.

Didžiausią grėsmę kurtiniams jų vakariniame paplitimo areale kelia gyvenamosios vietos naikinimas, ypač miškų pertvarkymas į vienos rūšies medienos plantacijas. Fragmentacija ir gyvenamosios aplinkos praradimas yra viena iš pagrindinių grėsmių biologinei įvairovei visame pasaulyje (Ezard, Travis, 2006). Mažėjant tinkamų kurtiniams gyvenamosios aplinkos fragmentų dydžiui ir didėjant jų izoliacijai, vietinės populiacijos tampa mažesnės ir labiau izoliuotos.

Kurtiniai yra laikomi indikatorine rūšimi, rodančia didelę biologinę įvairovę miškuose. Ši rūšis yra susijusi su laukinių gyvūnų gausa, įskaitant miško žinduolių ir paukščių rūšis, turinčias įvairius ekologinius ir gyvenamosios aplinkos poreikius. Todėl apsaugos strategijos, skirtos kurtiniams išsaugoti, gali turėti teigiamą poveikį ir kitų miško rūšių išlikimui.

Darbo tikslas - naudojant mikrosatelitinius ir mitochondrinės DNR žymenis ištirti Lietuvos (Viešvilės kurtinių veislyne auginamų) ir Baltarusijos (Belovežo girioje gyvenančių) kurtinių populiacijos genetinę įvairovę.

Darbo uždaviniai:

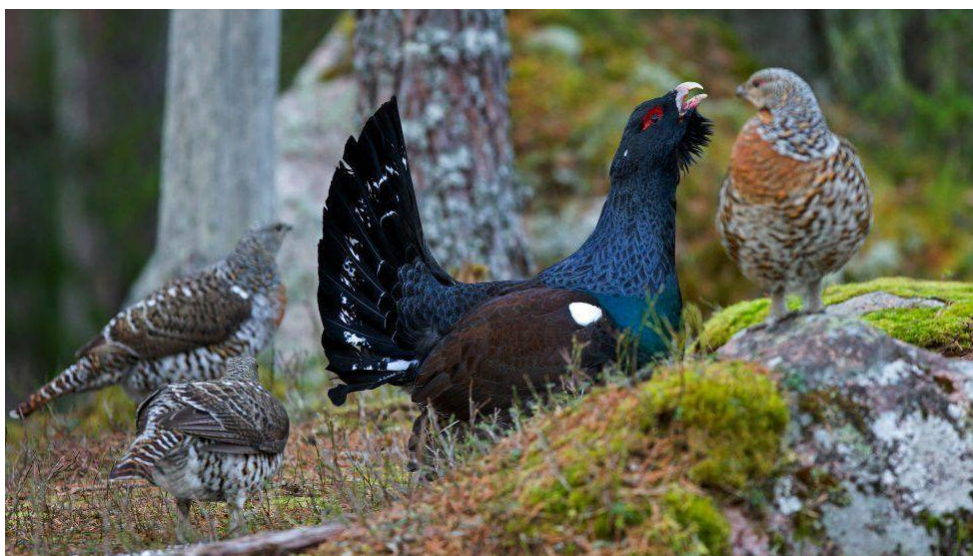
1. Naudojant 5 mikrosatelitinės DNR žymenis, genotipuoti Lietuvos ir Baltarusijos kurtinių populiacijas.
2. Palyginti genetinį atstumą tarp Lietuvos ir Baltarusijos kurtinių populiacijų Principinių koordinatų (PCoA) ašyse.
3. Nustatyti, kurie mikrosatelitų lokusai yra statistiškai reikšmingai nukrypę nuo Hardžio-Weinbergo pusiausvyros.
4. Palyginti Lietuvos ir Baltarusijos kurtinių mtDNR kontrolinio regiono sekoskaitos rezultatus.

1. LITERATŪROS APŽVALGATokių

1.1. Kurtinys (*Tetrao urogallus*)

Vakarinis kurtinys (*Tetrao urogallus*) (toliau kurtinys) – vienas stambiausių Lietuvos miškų paukščių. Priklauso *Aves* (paukščiai) klasės *Galliformes* (vištiniai paukščiai) būrio *Phasianidae* (fazaniniai) šeimos *Tetrao* (kurtiniai) genčiai (Registry-Migration.Gbif.Org, 2023).

Savo dydžiu ir plunksnų spalvotumu yra lengvai atpažįstamas. Suaugusio patino plunksnos pasižymi tamsiomis metališko blizgumo spalvomis. Sparnai tamsiai rudos beveik juodos spalvos su baltomis dėmelėmis. Uodega ilga su baltomis dėmelėmis, kurią tuoktuvių metu išskleidžia horizontaliai. Snapas šviesiai gelsvos spalvos, akys tamsios, virš jų yra ryškiai raudonas plikos odos plėmas. Patelės priešingai nei patinai, yra perpus mažesnės, ryškiai raibos, turi šviesiai rudas ir pilkas plunksnas (1.1 pav.).



1.1 pav. Kurtinio patinas ir patelės (Capercaillie one of Scotland's most endangered birds, 2022)

Kurtiniai gyvena miškuose ir medynuose, daugiausia spygliuočių arba mišriuose spygliuočių ir lapuočių miškuose (Willebrand, Åhlén, 2013). Šie paukščiai mėgsta didelius senus, šešėlių pilnus miškų plotus, drėgnas dirvas, pelkėtas vietas, durpynus ar laukus tankiais viržių augalų pomiškiais (McGowan, Madge, 2010). Žiemą kurtiniams patinka gyventi atviresniuose miškuose, o vasarą – tankesniuose miškuose, kur gausu vaiskrūmių. Šių paukščių patelės deda kiaušinius nuo balandžio vidurio iki birželio vidurio, bet daugiausia gegužę. Vienu metu išperama nuo šešių iki devynių kiaušinių (1.2 pav.)(McGowan, Madge, 2010).

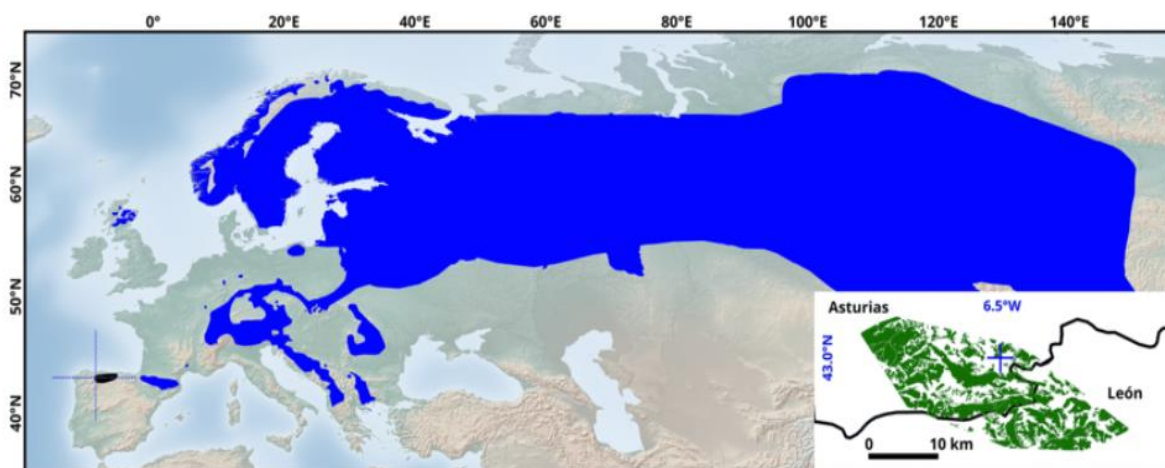


1.2 pav. Kurtinių kiaušiniai (Capercaillie one of Scotland's most endangered birds, 2022)

Lizdas - sekliai įdubęs, išklotas augalų lapais arba paukščių plunksnomis, dažnai randamas tankioje augmenijoje, medžio papėdėje (Harrison, Castell, 1998). Šiauriniuose arealo regionuose žiemą kurtiniai daugiausia minta pušų spygliais. Pietiniuose arealo regionuose žiemos mityba yra įvairesnė. Vasarą mityba yra praturtinama įvairiais spygliais, lapais, augalų stiebais ir įvairių augalų uogomis. Vabzdžiai yra svarbūs tik jaunų kurtinių mityboje. Kurtiniai daugiausiai sėslūs, nors žiemą gali vietiskai migruoti dėl maisto poreikio (de Juana, Kirwan, 2012).

Nepaisant plataus paplitimo, kurtinys (*Tetrao urogallus*) daugelyje Centrinės Europos šalių yra priskiriamas nykstančioms rūšims. Lietuvos raudonosios knygos (2021) duomenimis, kurtiniai yra priskiriami pažeidžiamiems (VU, angl. nuo *vulnerable*) taksonams (Rašomavičius, 2021).

Kurtinio paplitimas tęsiasi nuo vakarų Europos iki centrinės Europos, Rusijos (1.3 pav.).



1.3 pav. Kurtinių paplitimo arealas (María-José Bañuelos ir kt., 2019).

Per pastaruosius 100 metų kurtinių populiacija nuolat mažėja, to pasekoje vyksta populiacijos fragmentacija ir daugelio mažų, izoliuotų grupių išnykimas. Pagrindinės priežastys, kodėl *T. urogallus* populiacija mažėja, yra gyvenamosios vietos nykimas dėl netinkamų miškų tvarkymų, ekosistemų sutrikimai, pernelyg didelis medžioklės intensyvumas bei pramoninė tarša ir plėšrūnų tankumo padidėjimas (Strzala ir kt., 2015). Vien Lietuvoje 2015 metais (BirdLife International (2015) European Red List of Birds) buvo suskaičiuota nuo 300 iki 400 kurtinių.

Viešvilės rezervatas yra vienintelė Lietuvoje kurtinių veisykla, skirta atkurti jų populiaciją laukinėje gamtoje. Dėl to Lietuvoje veisiamų Kurtinių genetiniai tyrimai yra labai svarbūs, nes jų dėka gautų duomenų pagrindu yra kuriamos įvairios šios rūšies apsaugos strategijos.

1.2 Populiacijų genetinė įvairovė

Populiacijos genetika, tyrinėjanti genetinę įvairovę populiacijose ir jas formuojančias jėgas, yra svarbi sritis, turinti plačias pritaikymo galimybes (Brookfield, 1996). Ši disciplina ženkliai pažengė į priekį dėl molekulinų metodų, kurie suteikia išsamesnį supratimą apie viso genomo įvairovę (Charlesworth, 2010). Tokių veiksnių, kaip mutacijos, genetinis driftas, genų srautas, natūralioji atranka ir rekombinacija, sąveika yra ypač svarbi formuojant genetinę įvairovę (Edwards ir kt., 2022). Suprasti, kaip genetinė įvairovė keičiasi laikui bėgant, yra pagrindinis populiacijų genetikos ir filogenetikos tikslas, kuris yra evoliucinės biologijos, gamtos apsaugos biologijos ir susijusių disciplinų tyrimų pagrindas. Daugumoje empirinių tyrimų, genetinės įvairovės pavyzdžiai yra imamas iš jau egzistuojančių tyrimų šaltinių, o genetinių pokyčių modeliai naudojami siekiant interpretuoti, kokie veiksniai formavo stebimus dėsningumus (Lowry, 2010).

Genetinė įvairovė yra itin svarbi populiacijos ar rūšies savybė, nes taip populiacijos gali prisitaikyti prie aplinkos iššūkių (E Nevo, 2001). Dėl to didelė genetinė įvairovė yra laikoma pranašumu ar net būtinybe rūšies išlikimui kai keičiasi aplinkos veiksniai (klimato kaita, naujos rūšys, parazitai, ligos). Dėl žmogaus veiklos didelė dalis gyvūnų rūšių mažėja, dėl to esame įpareigoti imtis atsakomybės ir taikyti sprendimo bei apsaugojimo priemones, rūšių išsaugojimui (Ceballos ir kt., 2015). Pirmasis prioritetas kalbant apie populiacijų ir rūšių išsaugojimą, yra natūralių gyvenamųjų vietų (pavyzdžiui miškų) išsaugojimas. Nors tai nėra visada įmanoma, net kartais gali būti per vėlu. Genetinė įvairovė turėtų būti tyrinėjama visose rūšyse, ypač jau nykstančiose. Norint tirti populiacijos genetinę įvairovę bei giminingumą, tarp individų ir populiacijų, ar jos nebuvimą, dažnai naudojamas mikrosatelitų analizės metodas. Alelių dažniai gali būti lyginami tarp populiacijų, o genetinė struktūra populiacijų grupėse. Alelių skaičius kiekviename analizuotame lokuse yra svarbus rodiklis kartu su heterozigotiškumu ir genotipavimu

(Linløkken, 2017). Siekiant pagerinti ekonomiškai svarbių rūšių augimą bei išgyvenimą, reikia užtikrinti populiacijų ir rūšių dauginimąsi. Tai padaryti galima pasirinkant tinkamiausias poras kryžminimui, formuojant gyvūnų poras su pageidaujamais genais (Matsumoto ir kt., 2017). Nors yra plačiai manoma, kad didelė genetinė įvairovė yra tiesiogiai susijusi su rūšies sėkmingumu, yra ir tokių gyvūnų rūšių, kurie nepaisant mažos genetinės įvairovės yra sėkminga rūšis. Vienas iš pavyzdžių yra Afrikos gepardas (*Acinonyx jubatus*), jų tikėtinas heterozigotiškumas yra mažesnis nei 0,0153, tačiau ši rūšis gamtoje nerodo jokių inbridingo požymių (sumažėjęs vaisingumas, išgyvenimas, deformacijos) (Meißner ir kt., 2023). Dar viena sėkmingos rūšies su maža genetinė įvairove pavyzdys yra dvi albatrosų rūšys: klajojantis albatrosas (*Diomedea exulans*), paplitęs Pietų jūroje, veisiasi šešiose salose, kur jų skaičius siekia dešimtis tūkstančių, ir Amsterdamo albatrosas (*Diomedea amsterdamensis*), paplitęs Amsterdamo salose, Indijos vandenyne (Nel ir kt., 2003). Kuo mažesnė genetinė įvairovė ir populiacijos dydis, tuo didesnė genetinio dreifo bei butelio kaklelio efekto (angl. *bottleneck effect*) tikimybė (Markert ir kt., 2010). Dėl artimai bendraujančių giminingų porų, populiaciją gali ištikti inbridingo depresija su alelių praradimu (mažo dažnio). Nepaisant to, vidutinio dydžio laukinėse populiacijose inbridingas nebūtinai yra žalingas. Taip yra dėl to, nes tokio tipo inbridingas gali lemti recesyvinių kenksmingų alelių pašalinimą, ko pasekoje, populiacija gali tapti labiau prisitaikiusia prie savo aplinkos (López-Cortegano ir kt., 2016).

Nykstančių rūšių populiacijos paprastai yra mažos ir izoliuotos. Dėl to jos yra linkusios į stochastinius demografinius įvykius arba genetinius procesus, kurie padidina išnykimo tikimybę (Frankham, 2015). Todėl svarbu gamtos apsaugos pastangomis stebėti šias izoliuotas populiacijas tiek individų skaičiaus pokyčių, tiek genetinės įvairovės lygio atžvilgiu (P Hare ir kt., 2011).

1.3 DNR mikrosatelitiniai žymenys

Mikrosatelitai (nuo 1 iki 10 nukleotidų) ir minisatelitai (daugiau nei 10 nukleotidų) yra tandeminių pasikartojimų (TR) subkategorijos, kurios kartu su dominuojančiais išsklaidytais pasikartojimais (arba transpozoninių elementų liekanomis) sudaro genominius pasikartojančius regionus. TR yra evoliuciškai svarbūs dėl savo nestabilumo. Jie mutuoja 103 ir 106 kartus per ląstelės kartą (Gemayel ir kt., 2012). Mikrosatelitai, paprasti sekos pasikartojimai (SSR, angl. *simple sequence repeats*), trumpi tandemų pasikartojimai (STR, angl. *short tandem repeats*.) ir paprastos sekos ilgio polimorfizmai (SSLP, angl. *simple sequence length polymorphisms*) randami tiek prokariotuose, tiek eukariotuose. Jie yra plačiai paplitę visame genome, ypač koduojančioje ir nekoduojančioje branduolio bei organelių DNR (Pérez-Jiménez ir kt., 2013). Apskritai galima teigti, kad SSR pasikartojimų dažnis genų regionuose yra mažesnis, nes SSR pasižymi dideliu

mutacijų dažniu, kuris gali pakenkti genų ekspresijai. Tyrimai rodo, kad koduojančiuose regionuose vyrauja tri- ir heksanukleotidinio tipo SSR, nes atrankos spaudimas prieš mutacijas, keičiančias skaitymo rėmelį (angl. *reading frame*), yra stiprus (Xu ir kt., 2013). SSR gali atsirasti ir koduojančiuose regionuose, sukeldami pasikartojančių sekų atsiradimą baltymų sekose. Tyrimai baltymų sekų duomenų bazėse parodė, kad tandemų pasikartojimai yra dažni daugelyje baltymų, ir mechanizmai, dalyvaujantys jų susidaryme, gali prisidėti prie spartesnės baltymų evoliucijos (Katti ir kt., 2000). SSR galima klasifikuoti pagal motyvą į kelias grupes: tobuli (angl. *perfect*), jei sudaryti tik iš vieno motyvo pasikartojimų; netobuli (angl. *imperfect*), jei tarp pasikartojimų atsiranda pora bazių, nepriklausančių motyvui; pertraukti (angl. *interrupted*), jei į motyvą įterpiama kelių bazių porų seka; arba sudėtiniai (angl. *composite*), jei susidaro iš kelių gretimų, pasikartojančių motyvų (Olivera et al., 2006). Mikrosatelitiniai žymenys yra labai naudingi tiriant populiacijos struktūrą, genetinę įvairovę bei evoliucinius procesus (Vieira ir kt., 2016).

1.4 Mitochondrinės DNR žymenys

Mitochondrijos yra dinamiškos ir vienos svarbiausių organelių, jos yra randamos beveik visose eukariotinėse ląstelėse, kurių pagrindinė funkcija yra adenozino trifosfato (ATP) gamyba. Be to, mitochondrijos dalyvauja lipidų ir aminorūgščių apykaitoje ir atlieka svarbų vaidmenį įvairiuose ląstelių procesuose, tokiuose kaip ląstelių proliferacija, apoptozė ir ląstelių diferenciacija (Sato & Sato, 2013). Taip pat, mitochondrijos turi savo genomine DNR, kurioje kiekviena mitochondrija, kaip manoma, turi nuo vienos iki dešimties mitochondrinės DNR kopijų. Vienoje gyvūno ląstelėje galima atrasti net keletą tūkstančių mtDNR (Wiesner ir kt., 1992). Daugelyje lytiniu būdu besidauginančių gyvūnų yra pastebimas motininės mtDNR paveldimumas. Šį ne-Mendelinį paveldėjimo modelį galima paaiškinti keliais galimais mechanizmais, tokiais kaip mtDNR kiekio sumažėjimas spermatogenezės metu arba jos pašalinimas iš brandžių spermatozoidų. Kitos mtDNR praradimo zigotoje priežastys apima: po apvaisinimo vykdoma selektyvi tėvinės mtDNR degradacija ar net visos tėvinės mitochondrijos sunaikinimas (Sato & Sato, 2011). MtDNR yra idealus žymuo molekulinės įvairovės tyrimuose. Taip yra dėl to, nes mtDNR gali būti klonuojama, paveldima, jos molekulinė evoliucija yra neutrali arba beveik neutrali (Galtier ir kt., 2009). Mitochondrinės DNR ląstelių lygmenyje esanti įvairovė vadinama heteroplazmija (angl. *heteroplasmy*). Dėl minimalios rekombinacijos mtDNR, bet koks atsiradęs polimorfizmas gali būti tiksliai nustatomas filogenetiniame medyje (Dowling, 2014).

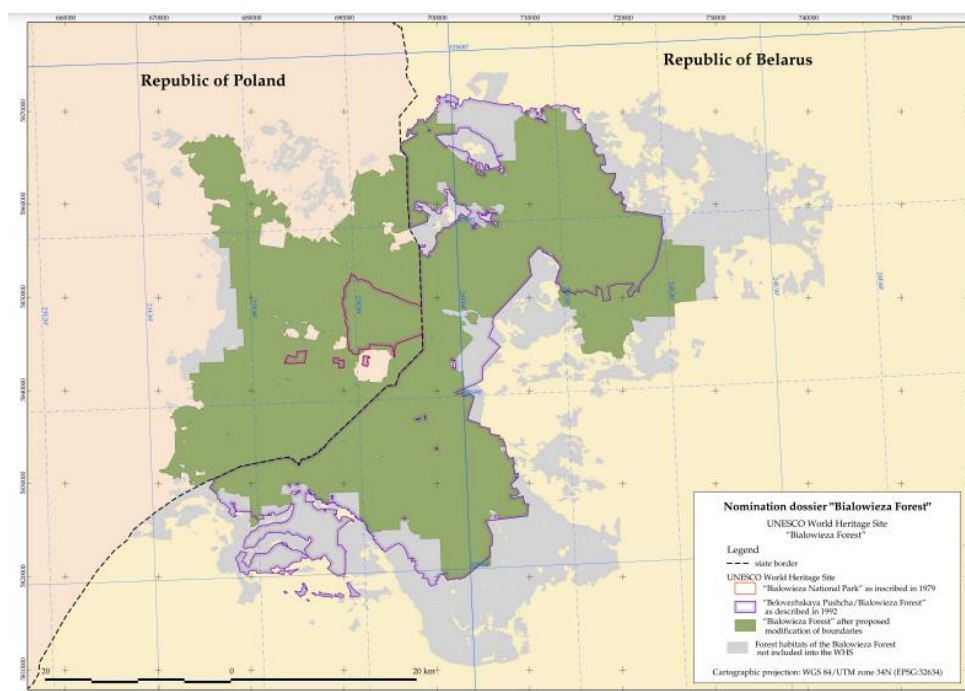
Ekspertimentiniuose tyrimuose mtDNR yra santykinai lengvai amplifikuojama, dėl jos didelio kopijų kiekio ląstelėse (Galtier ir kt., 2009). Natūraliose populiacijose mtDNR yra labai varibili dėl

padidėjusių mutacijų dažnumo. Tai gali suteikti informacijos apie populiacijų istoriją. Variabilios sritys (kontroliniai regionai) paprastai yra ribojamos labai konservatyvių sričių, kuriose galima sukurti PGR pradmenis (Bensasson ir kt., 2001). Mitochondrinė DNR yra viena pigiausių ir patogiausių žymenų genetinės įvairovės tyrimuose.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Kurtinių mėginiai

Lietuvos ir Baltarusijos kurtinių populiacijos magistrinio darbo tyrimams atlikti panaudoti 16 paukščių mėginiai. Lietuvos kurtinių populiacijos mėginiai (9 individų plunksnos) buvo surinkti Viešvilės rezervate, Lietuvoje. Tuo tarpu, Baltarusijos mėginiai (7 individų širdies ir kepenų audiniai) 2016 metais buvo surinkti Belovežo girios teritorijoje prie Baltarusijos ir Lenkijos sienos (2.1 pav.) ir laikyti 70 proc. etanolyje.



2.1 pav. Belovežo girios žemėlapis (UNESCO World Heritage Convention, 2014)

2.2 Eksperimentinė dalis

2.2.1 DNR skyrimas

Genominė DNR buvo išskirta iš 9 individų plunksnų ir 7 individų širdies arba kepenų audinių naudojant DNR išskyrimą pagal Aljanabi ir Martinez (1997) metodiką.

Į 1,5 ml tūrio Eppendorf mėgintuvėlį, su 400 µl druskos homogenizuojančiu tirpalu (0,4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM EDTA (pH 8,0)), įneštas 50 mg audinys arba 0,5-1 cm ilgio plunksnos spyglio bazalinis gabaliukas yra homogenizuojamas stiklinėmis lazdelėmis. Tuomet, į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama 40 µl 20 proc. SDS (natrio dodecilsulfatas) ir 8 µl 20 mg/ml Proteinazės K (fermentas). Tada viskas yra gerai išmaišoma ir inkubuojama termostate 1 valandą

65°C temperatūroje. Po inkubacijos į mėgintuvėlius įdedama 300 µl 6 M NaCl, gerai išmaišius (purtykle 20 s) centrifuguojama (Centrifuge 5415 R Eppendorf) 15 minučių, 10000 aps/min greičiu. Nucentrifugavus esantis supernatantas yra perpilamas į švarų mėgintuvėlį ir užpilamas 500 µl izopropanoliu bei gerai išmaišius įdedama 24 valandoms į šaldiklį (-20°C). Išėmus mėgintuvėlius vykdomas centrifugavimas (15 min, 10000 aps/min greičiu). Išpylus supernatantą, ant nuosėdų užpilama 200 µl 70 proc. etanolio. Tada etanolis yra nupilamas ir nuosėdos džiovinamos kambario temperatūroje 30 min. Ant išdžiuvusių nuosėdų užpilama 200 µl dejonizuoto vandens. Nuosėdo gerai išmaišomos ir ištirpinamos.

Išskirtos DNR koncentracija matuojama spektrofotometru (IMPLEN NanoPhotometer). DNR kokybei įvertinti buvo panaudota elektroforezė 1,5 proc. agarozės gelyje. Elektroforezė vykdoma (Biocom MP-300V) 30 min. 90 V įtampoje. Po elektroforezės gelis vertinamas UV šviesoje bei nufotografuojamas Biometra BioDoc Analyze aparate naudojant BioDocAnalyze programą.

2.2.2 Polimerazinė grandininė reakcija (PGR)

2.2.2.1 mtDNR kontrolinio regiono žymenys

Gamtos tyrimų centro (GTC) Molekulinės ekologijos laboratorijoje sukurti specifiniai kurtinių pradmenys, kurie amplifikuoja 553 bp ilgio fragmentą - pirmieji mitochondrinės DNR kontrolinio regiono nukleotidai (CRI - variabiliausias kurtinių gentyje (Bajc ir kt., 2011)). TetrF (tiesioginis pradmuo) 5'-TTCTCAACTACAG GAACAACAAA-3' ir TetrR (atvirkštinis pradmuo) 5'-GGGGAGAATAATGCACAGATG-3'.

Polimerazinė grandininė reakcija atlikta naudojant GeneAmp PCR System 9700 termociklerį. Kiekviena PGR reakcija atlikta 25 µl tūryje. Vienos reakcijos komponentai: 5 µl išskirtos genomines DNR, 12,5 µl DreamTaq DNR polimerazės mišinio (Thermo Fisher Scientific Baltic, Lietuva), 0,5 µl tiesioginio TetrF ir 0,5 µl atvirkštinio TetrR pradmens, 6,5 µl vandens be nukleazijų (Thermo Fisher Scientific Baltic, Lietuva). PGR sąlygos: pradinė denatūracija vykdyta 2 min 94 °C temperatūroje, 33 amplifikacijos ciklai (ciklo denatūracija 94 °C temperatūroje, 1 min.; ciklo pradmenų prijungimas 59 °C temperatūroje, 30 s; ciklo prailginimo žingsnis 72 °C temperatūroje, 1 min.) ir galutinis prailginimo žingsnis 72 °C temperatūroje, 5 min.

2.2.2.2 Mikrosatelitinės DNR žymenys

Baigiamojo darbo metu pasirinkti 5 hipervariabilūs mikrosatelitinės DNR lokusai: TUT1 - TUT4 bei BG18 (2.1 lentelė)(Segelbacher ir kt., 2000).

2.2 lentelė. Kurtinių mikrosatelitinės DNR lokusai ir jų charakteristika ((Segelbacher ir kt., 2000)

| Lokusas | Pradmens seka (5'-3') | Pasikartojimų tipas | Dydis, bp | Prisijungimo temperatūra, °C |
|---------|-----------------------------|----------------------|-----------|------------------------------|
| TUT1 | F: GGTCTACATTTGGCTCTGACC | (CTAT) ₁₂ | 217 | 60 |
| | R: ATATGGCATCCCAGCTATGG | | | |
| TUT2 | F: CCGTGTC AAGTTCTCCAAAC | (GATA) ₁₂ | 160 | 60 |
| | R: TTCAAAGCTGTGTTTCATTAGTTG | | | |
| TUT3 | F: CAGGAGGCCTCAACTAATCACC | (TATC) ₁₁ | 154 | 60 |
| | R: CGATGCTGGACAGAAGTGAC | | | |
| TUT4 | F: GAGCATCTCCCAGAGTCAGC | (TATC) ₈ | 179 | 60 |
| | R: TGTGAACCAGCAATCTGAGC | | | |
| BG18 | F: CCATAACTTA ACTTGCACTTTC | (CTAT) ₁₇ | 168 | 52 |
| | R: CTGATACAAAGATGCCTACAA | | | |

PGR atliktas tuo pačiu principu kaip ir minėta anksčiau 2.2.2.1 poskyriuje. PGR sąlygos: pradinė denatūracija vykdyta 5 min 95 °C temperatūroje, 35 amplifikacijos ciklai (ciklo denatūracija 94 °C temperatūroje, 45 s; ciklo pradmenų prijungimas 56 °C temperatūroje, 45 s; ciklo prailginimo žingsnis 72 °C temperatūroje, 45 s) ir baigiant galutiniu prailginimo žingsniu 72 °C temperatūroje, 5 min.

2.2.2.3 PGR produktų įvertinimas ir paruošimas sekvenavimui

Amplifikuotų mtDNR kontrolinio regiono fragmentų dydis buvo nustatytas atliekant elektroforezę 1,5 proc. agarozės gelyje naudojant Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus 30 min. 90 V įtampoje. Po elektroforezės gelis vertinamas UV šviesoje bei nufotografuojamas Biometra BioDoc Analyze aparate naudojant BioDocAnalyze programą. Tuo pačiu principu įvertinta ir mikrosatelitinės DNR lokusų fragmentai.

Sėkmingai amplifikuotų mikrosatelitinės DNR fragmentų išskyrimui ir tolimesnei analizei buvo naudojama vertikali elektroforezė 10 proc. poliakrilamido gelyje (20 ml 40 proc. akrilamido:1,4 proc. bis-akrilamido tirpalo, 8 ml 10X TBE buferio, 52 ml distiliuoto vandens, 154 µl TEMED ir 540 µl 10 proc. APS tirpalo). Pirmame šulinėlyje buvo įvesti 4 µl Gene RulerTM 50bp DNA Ladder, o į kitus šulinėlius – po 10 µl amplifikuotos DNR tirpalo, sumaišyto su 4 µl 6X

Loading Dye Solution ir 40 proc. sacharozės tirpalu. Tada buvo vykdoma elektroforezė omniPAGE Maxi Plus, 30 x 22 cm Dual aparate (BiocomDirect) 3,5 valandas (15 min. esant 120 V įtampai ir 3 val. 15 min. esant 220 V įtampai). Po elektroforezės gelis buvo 15 min. dažomas etidžio bromido tirpale, vėliau stebimas UV šviesoje ir nufotografuojamas naudojant BioDoc Analyze aparatą (Biometra).

Mitochondrinės DNR kontrolinio regiono PGR produktai buvo paruošti sekvenavimo reakcijoms naudojant egzonukleazių rinkinį. 5 µl PGR mišinio (kuriame yra padaugintas norimas fragmentas) sumaišoma su 0,5 µl egzonukleazės I ir 1 µl FastAP egzonukleazės. Reakcija vykdoma Mastercycler personal (Eppendorf) termocikleryje, pirmiausia 5 minutes 37°C temperatūroje, o vėliau 15 minučių 85°C temperatūroje.

2.2.2.4 Sekvenavimas

Ciklinio sekvenavimo reakcijos buvo paruoštos naudojant BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) 0,2 ml tūrio mėgintuvėliuose, bendrame 10 µl reakcijos tūryje, laikantis gamintojo protokolo (Applied Biosystems 2002). Reakcijoje buvo 3,2 pmol reikiamo pradmens (TetrF arba TetrR) ir 20 ng egzonukleazėmis išvalyto PGR produkto. Reakcijos buvo atliktos Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) termocikleryje. Pirmiausia buvo atliktas denatūracijos žingsnis 1 min. 96°C temperatūroje, po to reakcija vyko per 25 ciklus (denatūracija 10 s esant 96°C temperatūrai, pradmens prisijungimas 5 s esant 50°C temperatūrai ir prailginimo žingsnis 4 min. esant 60°C temperatūrai), galiausiai atšaldant iki 4°C temperatūros.

Produktams išgryninti buvo panaudotas etanolio/EDTA/natrio acetato precipitacijos metodas. Pirmiausia, ciklinio sekvenavimo reakcijos tirpalas buvo perkeltas į naujus 0,5 ml tūrio mėgintuvėlius. Į kiekvieną jų buvo pridėta po 1 µl 125 mM EDTA tirpalo, 1 µl 3 M natrio acetato tirpalo (Fermentas) ir 29 µl 95 proc. etanolio. Mėgintuvėliai buvo gerai supurtyti naudojant Desaga MM1 aparatą, trumpai centrifuguoti su Centrifuge 5415R (Eppendorf) centrifuga ir palikti 15 min. kambario temperatūroje. Po to mėgintuvėliai buvo centrifuguoti 20 min. 13200 aps/min greičiu. Iš kiekvieno mėgintuvėlio, neliečiant jo sienelių, automatine pipete buvo pašalintas visas tirpalas. Tuomet buvo pridėta po 70 µl 70 proc. etanolio, supurtyta ir centrifuguota 10 min. 13200 aps/min greičiu. Šis etapas buvo pakartotas du kartus. Atidengti mėgintuvėliai buvo laikomi 30 min. kambario temperatūroje. Vėliau buvo pridėta po 10 µl Hi-Di™ formamido (Applied Biosystems), mėgintuvėliai buvo supurtyti ir trumpai centrifuguoti. Galiausiai mėginiai buvo denatūruojami 95°C temperatūroje 2 min. ir atšaldomi iki 4°C temperatūros naudojant Mastercycler personal (Eppendorf) termociklerį.

Sekos buvo nustatytos Gamtos tyrimų centro (GTC) Molekulinės ekologijos laboratorijoje, naudojant 8 kapiliarų 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/HITACHI) genetinį analizatorių. Reakcijos buvo atliktos 96-Well Optical Reaction Plate (Applied Biosystems) plokštelėse pagal gamintojo protokolą (Applied Biosystems 2009). Pirminė nustatytų sekų analizė buvo atlikta naudojant 3500 Data Collection Software Version 1.0.0 programinę įrangą.

2.3 Duomenų analizė

Po fragmentų analizės genetiniu analizatoriumi, kiekvienas gautas elektroferogramos failas buvo atskirai analizuojamas naudojant GeneMapper programą. GeneMapper programa sukuria elektroferogramos failą kaip grafiką, kuris rodo santykinę dažų koncentraciją ir laiką, koreguotą pagal DNR dydį. Mikrosatelitinės DNR fragmentų analizės elektroferogramą sudaro dvi ašys – fluorescencijos intensyvumas ir fragmento dydis. Priklausomai nuo naudojamo dažo (fluorochromo), fluorescencijos spalvos elektroferogramose gali skirtis. Alelių vertinimas lokuse buvo atliekamas atsižvelgiant į aukščiausių bangų aukštį ir jų bei šalia esančių bangų profilius. Individai, kurių elektroferogramose matomos dvi aiškiausios, aukščiausios bangos reikiamame lokuse, buvo vertinami kaip heterozigotiniai, o su viena aiškia aukščiausia banga – kaip homozigotiniai.

Tirtų mikrosatelitinės DNR lokusų alelių dažniai, HO (stebimas heterozigotiškumas), HE (tikėtinas heterozigotiškumas) ir nuokrypis nuo Hardžio-Vainbergo pusiausvyros (HVP) buvo apskaičiuoti naudojant GenePop 4.7.5 programą. GenAlEx programa buvo panaudota genetiniams atstumams pagal Nei tarp Lietuvos ir Baltarusijos kurtinių populiacijos imčių apskaičiuoti. Naudojant tą pačią programą, buvo apskaičiuoti alelių dažnis, Na (skirtingų alelių skaičius), Ne (efektyvus alelių skaičius), Shannon'o informacinis indeksas ir molekulinė variacija.

Po sekoskaitos gautos mtDNR D-kilpos sekos buvo peržiūrimos naudojant CHROMAS 2.6.6 programą. Kiekviena seka buvo atskirai peržiūrėta dėl neaiškių nukleotidų ir galimų klaidingų nukleotidų persidengimų; radus tokius, buvo įvertintas pozicijos patikimumas ir klaidos buvo rankiniu būdu koreguojamos. Sekų palyginimai buvo atlikti MEGA11 programoje naudojant ClustalW algoritmą. Haplotipų nustatymui buvo panaudotos CHROMAS 2.6.6, dnasp 61203 ir Popart 1.7 programos. Haplotipų tinklas buvo nubraižytas naudojant Popart 1.7 programą. Lietuvos ir Baltarusijos kurtinių dendrograma buvo sudaryta kaimynų jungimo (angl. *neighbour joining*, NJ) metodu, jos patikimumas įvertintas pradinės įkelties (angl. *bootstrap*) testu, pritaikius 1000 permutacijų ir naudojant MEGA11 programą.

3. REZULTATAI

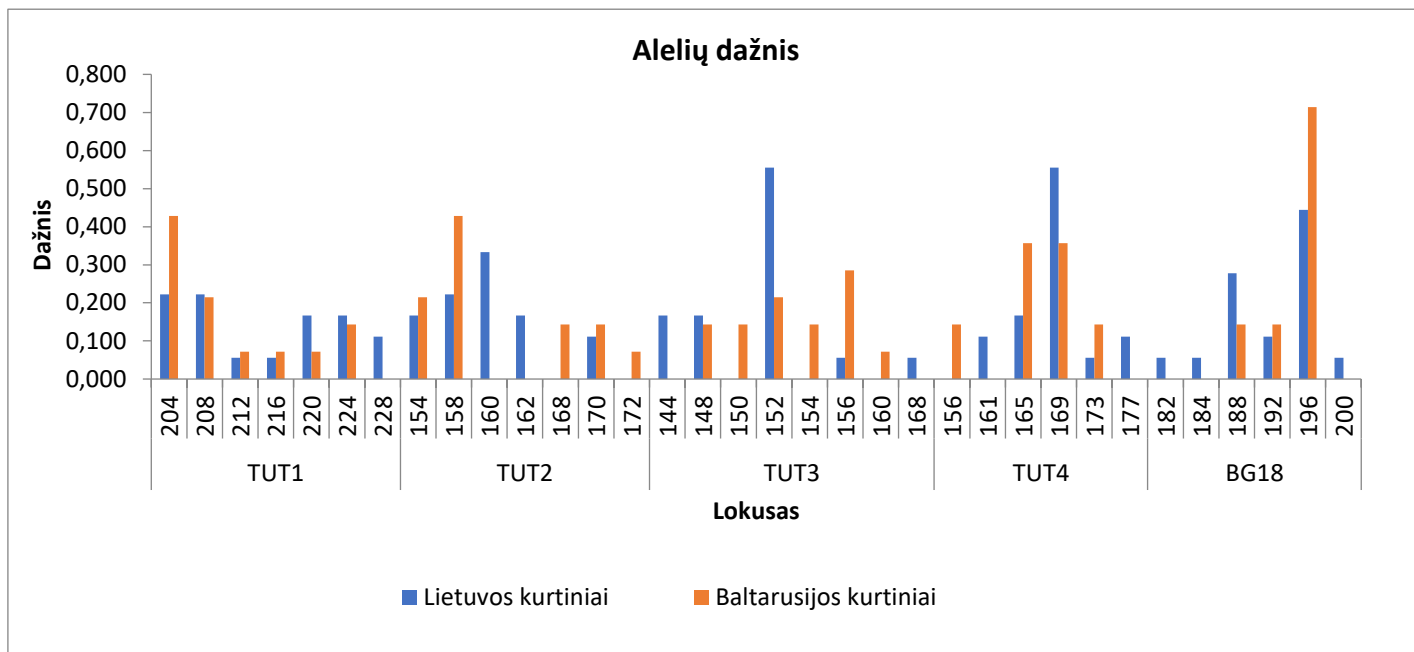
3.1 Lietuvos ir Baltarusijos kurtinių DNR mikrosatelitinių žymenų genotipavimo rezultatai

Baigiamojo darbo metu buvo genotipuojama 16 individų, pasinaudojant 5 mikrosatelitų lokusais (3.1 lentelė). Individai išskirti į dvi grupes: Lietuvos kurtiniai (L) ir Baltarusijos kurtiniai (B).

3.1 lentelė. 16 kurtinių individų genotipavimo rezultatai.

| Mėginys | TUT1 | TUT2 | TUT3 | TUT4 | BG18 |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| L1 | 204/212 | 162/170 | 152/168 | 161/165 | 188/200 |
| L2 | 224/224 | 160/160 | 144/152 | 169/169 | 188/196 |
| L3 | 216/220 | 160/160 | 152/156 | 169/169 | 192/196 |
| L4 | 204/208 | 158/158 | 148/152 | 161/169 | 188/196 |
| L5 | 220/224 | 160/160 | 152/152 | 173/177 | 184/196 |
| L6 | 208/228 | 154/162 | 148/152 | 165/169 | 182/196 |
| L7 | 208/228 | 154/162 | 148/152 | 165/169 | 192/196 |
| L8 | 204/220 | 158/158 | 144/152 | 169/169 | 188/196 |
| L9 | 204/208 | 154/170 | 144/152 | 169/177 | 188/196 |
| B1 | 204/216 | 154/168 | 148/152 | 165/169 | 192/196 |
| B2 | 204/204 | 158/158 | 156/156 | 169/173 | 196/196 |
| B3 | 208/220 | 158/158 | 148/152 | 169/173 | 188/196 |
| B4 | 204/212 | 170/170 | 156/160 | 169/169 | 188/196 |
| B5 | 204/204 | 168/172 | 150/154 | 156/156 | 192/196 |
| B6 | 208/224 | 154/158 | 152/156 | 165/165 | 196/196 |
| B7 | 208/224 | 154/158 | 150/154 | 165/165 | 196/196 |

Naudojantis GenAlEx programa iš tyrimo metu gautų lokusų buvo paskaičiuotas alelių dažnis kiekviename lokuse bei individų grupėje (3.1 pav.). TUT1 lokuse dažniausiai pasitaikę aleliai Baltarusijos kurtinių grupėje bei Lietuvos kurtinių grupėje buvo 204 bei 208. 228 alelis pastebėtas tik Lietuvos kurtinių grupėje. TUT2 lokuse 160 ir 162 alelius turi tik Lietuvos kurtinių grupė. Didžiausias alelių dažnis Lietuvos ir Baltarusijos kurtinių grupėse buvo pastebėtas BG18 lokuse ties 196 aleliu.



3.1 pav. Alelių dažnis kiekviename lokuse.

Taip pat, naudojant GenA1Ex programą, buvo nustatyti populiacijų alelių įverčiai ir indeksai (3.2 lentelė). Na nurodo skirtingų alelių skaičių kiekvienam lokusui, t. y., nurodo ar tai homozigotinis ar heterozigotinis lokusas. Lietuvos kurtinių populiacijoje Na vidurkis yra 5,6, o Baltarusijos kurtinių mažesnis (4,8). Ne įvertis – efektyvus alelių skaičius (angl. Effective Alleles) – alelių dažnis, reikalingas pasiekti tokį patį heterozigotiškumo laipsnį kaip tirtoje populiacijoje. Kitaip tariant, tai alelių skaičius, kuris gali egzistuoti populiacijoje. Lietuvos ir Baltarusijos kurtinių populiacijoje šis dažnis yra žemesnis už Na. Taip pat buvo apskaičiuotas I – Shannon informacinis indeksas (angl. Shannon's Information Index). Šis indeksas genetinės variacijos matas, kurio didesnė reikšmė nurodo didesnę variaciją. Lietuvos kurtinių indekso reikšmė didesnė palyginus su Baltarusijos kurtinių populiacija.

3.2 lentelė. Tirtų populiacijų alelių įverčiai ir indeksai: Na – skirtingų alelių skaičius, Ne – efektyvus alelių skaičius (angl. Effective Alleles), I – Shannon'o informacinis indeksas (angl. Shannon's Information Index), SE – standartinė paklaida (angl. standard error).

| Populiacija | | N | Na | Ne | I |
|------------------------|----------|-------|-------|-------|-------|
| Lietuvos kurtiniai | Vidurkis | 9,000 | 5,600 | 3,797 | 1,467 |
| | SE | 0,000 | 0,400 | 0,582 | 0,106 |
| Baltarusijos kurtiniai | Vidurkis | 7,000 | 4,800 | 3,550 | 1,355 |
| | SE | 0,000 | 0,583 | 0,533 | 0,155 |

Nustatytas bei tikėtinas heterozigotiškumas buvo paskaičiuotas naudojant Genepop internetiniu įrankiu (3.3 lentelė.). Visų lokusų išskyrus TUT2 nustatytas heterozigotiškumas yra didesnis už tikėtiną heterozigotiškumą. Taip pat, TUT2 lokusas yra statistiškai reikšmingai nukrypęs nuo Hardžio-Veinbergo pusiausvyros.

3.3 lentelė. Lietuvos kurtinių heterozigotiškumas. HO - nustatytas heterozigotiškumas, HE - tikėtinas heterozigotiškumas, N - individų skaičius.

| Locus | H _o | H _e | P-value | N |
|-------|----------------|----------------|---------|---|
| TUT1 | 0.89 | 0.83 | 0.335 | 9 |
| TUT2 | 0.44 | 0.77 | *<0.001 | 9 |
| TUT3 | 0.89 | 0.63 | 0.888 | 9 |
| TUT4 | 0.66 | 0.63 | 0.608 | 9 |
| BG18 | 1.00 | 0.70 | 0.449 | 9 |

Visų Baltarusijos kurtinių grupės lokusų išskyrus TUT3 ir BG18 nustatytas heterozigotiškumas yra mažesnis už tikėtiną heterozigotiškumą. Taip pat, TUT4 lokusas yra statistiškai reikšmingai nukrypęs nuo Hardžio-Veinbergo pusiausvyros (3.4 lentelė.).

3.4 lentelė. Baltarusijos kurtinių heterozigotiškumas. HO - nustatytas heterozigotiškumas, HE - tikėtinas heterozigotiškumas, N - individų skaičius.

| Locus | H _o | H _e | P-value | N |
|-------|----------------|----------------|---------|---|
| TUT1 | 0.71 | 0.74 | 0.162 | 7 |
| TUT2 | 0.57 | 0.72 | 0.075 | 7 |
| TUT3 | 0.86 | 0.80 | 0.151 | 7 |
| TUT4 | 0.43 | 0.70 | *0.057 | 7 |
| BG18 | 0.57 | 0.45 | 1.000 | 7 |

Genetiniai atstumai (D) (3.5 lentelė.) ir identiškumas (I) (3.6 lentelė.) nustatyti Nei metodu. Šiuo metodu nustatytas atstumas $< 0,3$ ir genetinis identiškumas $< 0,8$.

3.5 lentelė. Nei genetinių atstumų matrica.

| | | |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Lietuvos kurtiniai | Baltarusijos kurtiniai | |
| 0,000 | | Lietuvos kurtiniai |
| 0,286 | 0,000 | Baltarusijos kurtiniai |

3.6 lentelė. Nei genetinio identiškumo matrica.

| | | |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Lietuvos kurtiniai | Baltarusijos kurtiniai | |
| 1,000 | | Lietuvos kurtiniai |
| 0,751 | 1,000 | Baltarusijos kurtiniai |

AMOVA analizės parodė (3.7. lentelė.), kad genetinė variacija populiacijų viduje (97 proc.) buvo didesnė nei tarp populiacijų (3 proc.). Statistiškai reikšmingo skirtumo nepastebėta.

3.7 lentelė. dF – laisvės laipsniai (angl. degrees of freedom), SS – kvadratų suma (angl. sum of squares), MS – kvadratų vidurkis (angl. mean of squares), variacijos laipsnis PhiPT.

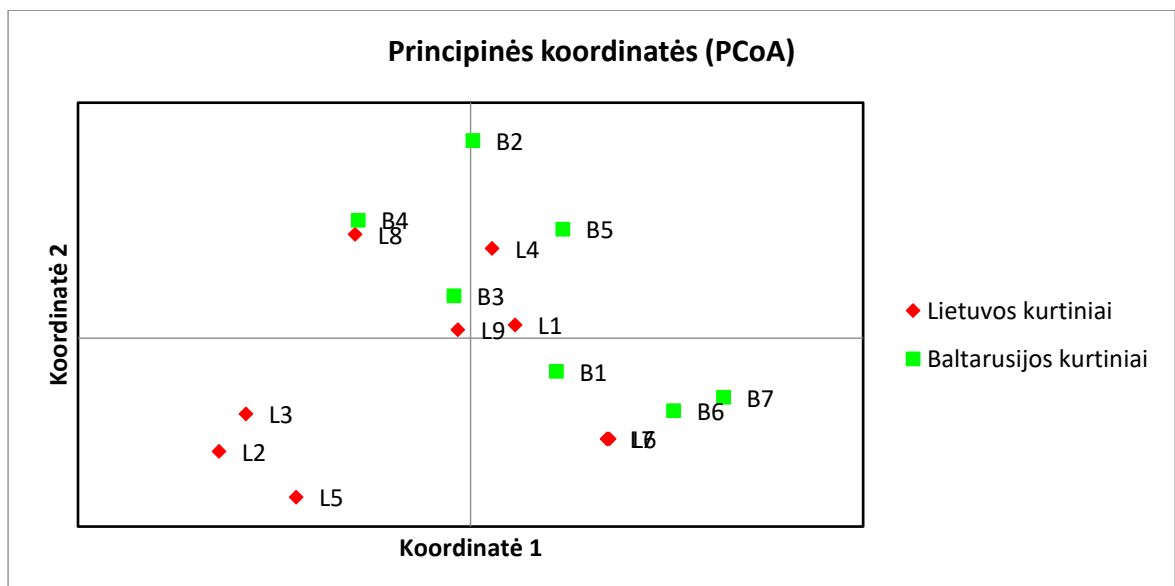
| Skirtumai | df | SS | MS | Variacijos įvertis | Visos variacijos procentinė dalis, % | P-value |
|----------------------------|----|--------|-------|--------------------|--------------------------------------|---------|
| Tarp populiacijų | 1 | 1,720 | 1,720 | 0,043 | 3 | 0,117 |
| Populiacijos viduje | 14 | 19,363 | 1,383 | 1,383 | 97 | |
| Iš viso | 15 | 21,083 | | 1,426 | 100 | |

Skritulinė diagrama (3.2 pav.), nurodanti genetinės įvairovės pasiskirstymo proporciją populiacijų viduje ir tarp populiacijų buvo nuprėžta naudojantis GenAEx programa, pagal gautus AMOVA rezultatus. Lietuvos ir Baltarusijos populiacijų viduje molekulinė variacija yra didesnė nei tarp šių populiacijų.



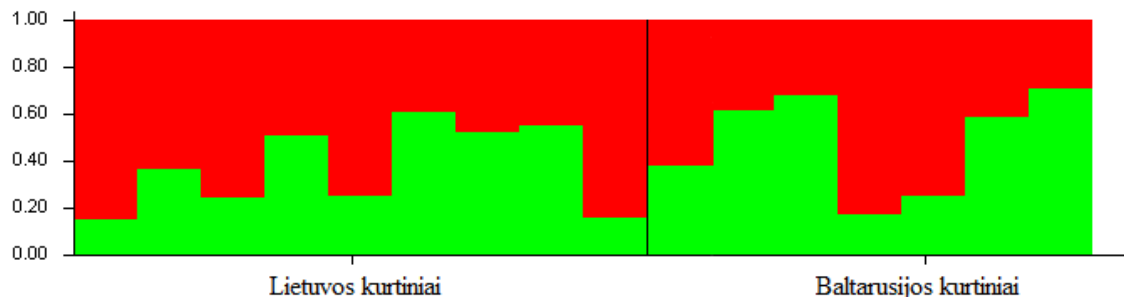
3.2 pav. Skritulinė diagrama, nurodanti genetinės įvairovės pasiskirstymo proporciją populiacijų viduje ir tarp populiacijų pagal AMOVA rezultatus.

Toliau naudojantis GenAlEx programa buvo nubrėžtas principinės koordinatės (PCoA) grafikas (3.3 pav.). Tai duomenų analizės metodas, paremtas daugiadimensinėmis duomenų skalėmis. Analizuojamas panašumas tarp mėginių. Šiame grafike matoma, kad dauguma individų klasterizuojasi šalia vienas kito. L3, L2 ir L5 (Lietuvos kurtinių grupės individai) yra atsiskyrę ir klasterizuojasi arti vienas kito. L1, L4, L6-L9 artimai klasterizuojasi kartu su Baltarusijos kurtinių individais (B1-B7).



3.3 pav. Principinių koordinatės analizės (PCoA) grafikas, paremtas euklidinių atstumų matrica.

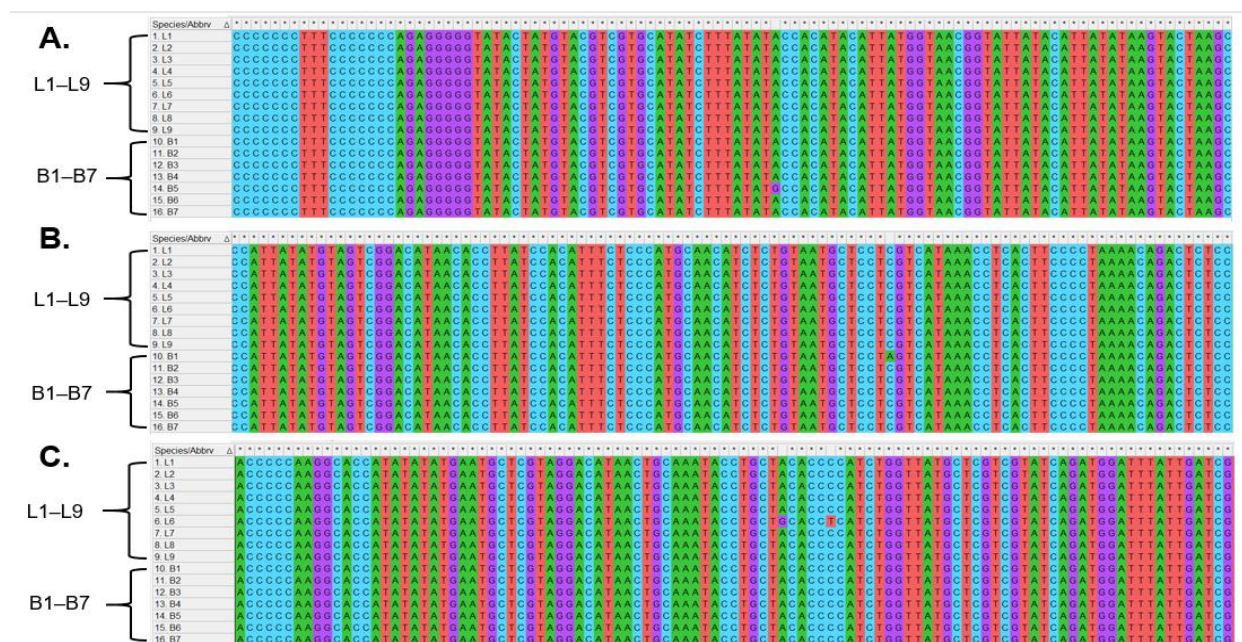
Norint nustatyti genetinės struktūros pasiskirstymą populiacijoje, buvo naudojama Structure 2.3.4 programa (3.4 pav.). Lietuvos ir Baltarusijos kurtinių genetinė struktūra yra labai panaši, iš pirmo žvilgsnio būtų galima pagalvoti, kad tai viena ir ta pati populiacija.



3.4 pav. Juostinė diagrama parodanti Lietuvos ir Baltarusijos kurtinių struktūros diferencijavimą, atliktas su Structure programa, K = 2.

3.2 Lietuvos ir Baltarusijos kurtinių mtDNR D-kilpos sekų analizės rezultatai

Lietuvos ir Baltarusijos kurtinių mitochondrinės DNR (kontrolinio regiono pradžia, pirmasis iš trijų kontrolinio regiono domėnų (CRI)) daugybinių sekų palyginys tarp 16 individų buvo padarytas MEGA11 programoje (3.5 pav.). Sekos sulygintos naudojant ClustalW algoritmą.



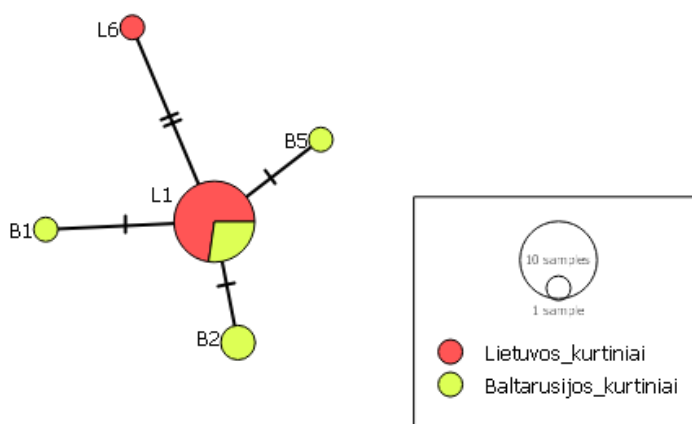
3.5 pav. Daugybinių sekų palyginys tarp 16 individų padarytas naudojant MEGA11 programą.

Tarpusavyje lyginant Lietuvos ir Baltarusijos kurtinių gautas sekas, jos buvo sutrumpintos iki optimalaus 448 bp ilgio fragmento. Analizuojant šias sekas, jose nustatytos 5 variabilios pozicijos ir 5 skirtingi haplotipai (3.8 lentelė). Dažniausiai pasitaikantis haplotipas tirtų individų tarpe yra Hap 1. Daugiausiai skirtingų haplotipų pasitaikė Baltarusijos kurtinių populiacijoje.

3.8 lentelė. Skirtingi kurtinių mtDNR D-kilpos haplotipai.

| Haplotipai | Variabili pozicija, bp | | | | | N | Šalis |
|------------|------------------------|-----|-----|-----|-----|----|----------------------|
| | 57 | 173 | 265 | 270 | 343 | | |
| Hap 1 | A | C | A | C | T | 11 | Lietuva, Baltarusija |
| Hap 2 | G | . | . | . | . | 1 | Baltarusija |
| Hap 3 | . | A | . | . | . | 1 | Baltarusija |
| Hap 4 | . | . | G | T | . | 1 | Lietuva |
| Hap 5 | . | . | . | . | C | 2 | Baltarusija |
| Iš viso | | | | | | 16 | |

Naudojant Popart 1.7 programą, buvo sukurtas haplotipų tinklas (3.6 pav.). Dažniausiai pasitaikantis haplotipas aptinkamas tiek lietuviškoje, tiek baltarusiškoje kurtinių imtyse, rečiau aptinkami haplotipai atskirti nuo pagrindinio haplotipo viena taškine mutacija, priklauso baltarusiškiems kurtiniams, išskyrus haplotipą L6, kuri skiria nuo L1 haplotipo du mutaciniai žingsniai. Tai gali būti susiję su geografine šio individo izoliacija nuo likusių tirtų kurtinių, kadangi paukštis buvo atgabentas į Viešvilės veislyną iš Švedijos.



3.6 pav. Median-joining haplotipų tinklas, sudarytas iš nustatytų haplotipų naudojant PopArt 1.7

REZULTATŲ APTARIMAS

Baigiamojo darbo metu naudojant mikrosatelitinius ir mitochondrinės DNR žymenis buvo ištirta Lietuvos (Viešvilės kurtinių veislyne auginamų) ir Baltarusijos (Belovežo girioje gyvenančių) kurtinių populiacijos genetinė įvairovė. Iš viso buvo tiriami 9 Lietuvos populiacijos ir 7 Baltarusijos populiacijos individai.

Lietuvos ir Baltarusijos kurtinių populiacijose atitinkami aleliai yra dažnesni. Pavyzdžiui, Baltarusijos kurtinių populiacijoje aleliai 204 (TUT1), 158 (TUT2), 156 (TUT3), 165 (TUT4) ir 196 (BG18) yra dažnesni. Lietuvos kurtinių populiacijoje, priešingai, 160 (TUT2), 152 (TUT3) ir 169 (TUT4) yra dažnesni. Baltarusijos ir Lietuvos kurtinių populiacijose, Na (skirtingų alelių skaičius) reikšmės yra panašios. Tai taip pat yra palyginant sveiki skaičiai, jie rodo, kad vidutiniškai genų pulke yra bent 5 aleliai. Shannon'o indekso vertė nurodo populiacijos įvairovę. Kuo didesnis indeksas, tuo rūšies įvairovė tiriamoje populiacijoje yra didesnė. Kuo mažesnis indeksas, tuo mažesnė įvairovė (Bobbitt, 2021). Šiuo atveju, Lietuvos kurtinių populiacijoje Shannon'o indekso vertė yra didesnė nei Baltarusijos kurtinių populiacijoje, kas nurodo didesnę įvairovę Lietuvos kurtiniuose.

Nustatytas heterozigotiškumas Lietuvos kurtinių populiacijoje yra didesnis nei tikėtinas heterozigotiškumas beveik visuose lokusuose (išskyrus TUT2), tai reiškia, kad šiai populiacijai negresia inbrydingo depresija. Kadangi, TUT2 lokusas nukrypo nuo HWE galime teigti, kad Viešvilės rezervate auginami kurtiniai yra veiksmingai apsaugoti nuo inbrydingo. Kita vertus, Baltarusijos kurtinių heterozigotiškumas yra mažesnis nei tikėtinas heterozigotiškumas 3 lokusuose. Tik vienas lokusas nukrypo nuo HWE, tačiau tai nereiškia, kad likusieji išvengia rizikos dėl genotipų disbalanso. Heterozigotiškumo praradimas gali rodyti individų praradimą (butelio kaklelio efektas (angl. *bottleneck effect*)) dėl galbūt natūralių priežasčių, kas taip pat pastebima dėl to, kad jų Na (skirtingų alelių skaičius) yra mažesnis nei Lietuvos kurtinių populiacijoje.

Atstumo analizė rodo, kad fizinis barjeras tarp šių dviejų populiacijų, esančių skirtingose šalyse, paveikė juos genetiškai – yra pakankamas atstumas, kad būtų galima manyti, jog populiacijos yra skirtingos.

Didžioji dauguma molekulinės įvairovės yra randama populiacijos viduje tarp individų, kas rodo, kad genetinė įvairovė tarp populiacijų nėra pakankamai didelė, kad parodytų dviejų atskirų populiacijų skirtumus. Tai reiškia, kad tarpusavyje populiacijos yra pakankamai panašios. P-vertė nėra reikšminga, tai gali būti dėl mažo mėginių skaičiaus, arba dėl to, kad įvairovė tarp populiacijų yra maža. Priešingus rezultatus su didesniu mėginių skaičiumi (292 individai) gavo Segelbacher & Storch (2002) tirdami kurtinių populiacijas gyvenančias Alpėse ir populiacijas gyvenančias kalnų

pakraščiuose. Visose kurtinių populiacijose buvo nustatytas didelis genetinės įvairovės lygis, didelis heterozigotiškumas. Pastarasis, parodo galimą populiacijos sumažėjimą.

PCoA rodo, kad Lietuvos kurtinių populiacija ir Baltarusijos kurtinių populiacija dažnai persidengia. Yra keletas mėginių – L3, L2 ir L5 – kurie atskirti nuo kitų mėginių grupės, ir tai rodo, kad šie individai turi unikalią genetinę medžiagą.

Structure programa atlikta struktūros analizė rodo, kad šios populiacijose struktūriškai yra labai panašios, beveik nėra skirtumo tarp populiacijų. Yra šiek tiek skirtumų tarp atskirų mėginių, bet nedaug. Panašius rezultatus Lenkijoje tarp fermoje auginamų ir laisvėje randamų kurtinių gavo Rutkowski ir kt. (2017). Lenkijos kurtinių populiacijoje (structure programa) gauti rezultatai parodė panašius struktūrinius raštus tiek laukinėse, tiek fermose laikomų kurtinių populiacijose. Šis mažas skirtumas tarp populiacijų parodo, kad jos nebuvo pakankamai ilgai atskirtos viena nuo kitos ir/arba skirtingos kurtinių gyvenamosios vietos nesiskyrė taip drastiškai, kad išsiskirtų jų genetinė struktūra.

Gauti mtDNR sekų rezultatai parodė kokius panašumus tarpusavyje yra Lietuvos ir Baltarusijos kurtiniai, tačiau tuo pačiu metu dėl didesnio haplotipų kiekio Baltarusijos (5 haplotipai) kurtinių populiacijoje lyginant su Lietuvos kurtinių populiacija (2 haplotipai), galime teigti, kad laukinėje gamtoje gyvenantys Baltarusijos kurtiniai turi didesnę genetinę įvairovę. Strzała ir kt. (2015), taip pat, tyrė mtDNR haplotipus tarp nelaisvėje auginamų ir gamtoje sutinkamų kurtinių. Nelaisvėje auginami kurtiniai turėjo 6 haplotipus, kai tuo tarpu, gamtoje gyvenantys kurtiniai turėjo 7 haplotipus. Šie rezultatai, taip pat, parodo laisvėje gyvenančių kurtinių didesnę genetinę įvairovę. Didesnę genetinę įvairovę laikiniuose kurtiniuose gali lemti nekontroluojamas ir neprižiūrimas dauginimasis, migracija.

Iš gautų rezultatų galime teigti, kad Lietuviška kurtinių populiacija yra genetiškai artima Baltarusijos kurtinių populiacijai. Tai rodo, kad Viešvilės rezervate vykdoma kurtinių reintrodukcijos programa yra veiksminga, nes rezervate auginti kurtiniai yra panašūs su natūralioje gamtoje augančiais kurtiniais. Tačiau taip pat, pastebime, kad Baltarusijos kurtinių populiacija, kuri gyvena Belovežo girioje, turi daugiau genetinės įvairovės nei Lietuvos kurtinių populiacija auginama Viešvilės rezervate.

IŠVADOS

1. Naudojant 5 mikrosatelitinių DNR žymenų (TUT1, TUT2, TUT3, TUT4, BG18) pradmenų poras, buvo genotipuoti 16 kurtinių individų, priskirtinų Lietuvos (Viešvilės kurtinių veislyne auginami kurtiniai) ir Baltarusijos (Belovežo girioje gyvenantys kurtiniai) populiacijoms.
2. Principinių koordinačių (PCoA) grafike Baltarusijos kurtiniai klasterizuojasi su dalimi Lietuviškos kurtinių populiacijos atstovų, tačiau trys Lietuvos kurtinių grupės individai (L3, L2 ir L5) yra nutolę nuo kitų formuodami atskirą klasterį grafike. Šie individai gali būti geografiškai tolimesnių populiacijų atstovų palikuonys.
3. Lietuvos kurtinių populiacijoje statistiškai reikšmingai nukrypęs nuo Hardžio-Veinbergo pusiausvyros mikrosatelitinės DNR lokusas buvo: TUT2. Baltarusijos kurtinių populiacijoje statistiškai reikšmingai nukrypęs nuo Hardžio-Veinbergo pusiausvyros mikrosatelitinės DNR lokusas buvo: TUT4.
4. mtDNR kontrolinio regione nustatyti penki skirtingi haplotipai, iš kurių tik dažniausias haplotipas L1 paplitęs Lietuvos ir Baltarusijos kurtinių populiacijose. Laukinėje gamtoje gyvenanti Baltarusijos kurtinių populiacija pasižymi didesne haplotipų įvairove lyginant su Viešvilės rezervate auginamų Lietuvos kurtinių imtimi.

ASMENINIO INDĖLIO APRAŠYMAS

Baigiamojo darbo metu iš turimų kurtinių medžiagos skyriau DNR, atlikau polimerazines grandines reakcijas (PGR) naudojant 5 mikrosatelitinių žymenų pradmenis bei TetriR ir TetriF pradmenų porą. Atlikau gautų mtDNR D-kilpos sekų ir mikrosatelitinių žymenų genotipavimo analizę. Atlikau ir darbe pateikiau statistinę analizę.

PADĖKA

Noriu nuoširdžiai padėkoti savo darbo vadovui dr. (HP) Daliui Butkauskui už visokeriopą pagalbą, nuostabų bendravimą, suteiktas žinias ir suteiktą galimybę atlikti magistro baigiamąjį darbą Gamtos tyrimų centre (GTC), Molekulinės ekologijos laboratorijoje.

Taip pat, norėčiau padėkoti visam Gamtos tyrimų centro (GTC), Molekulinės ekologijos laboratorijos nuostabiam kolektyvui už nuoširdų bendravimą ir suteiktą pagalbą bei žinias.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction—PMC.

(s.a.). Gauta 2024 m. gegužės 24 d.,

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4640606/>

Aljanabi, S. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22), 4692–4693.

<https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>

Bajc, M., Čas, M., Ballian, D., Kunovac, S., Zubić, G., Grubešić, M., Zhelev, P., Paule, L.,

Grebenc, T., & Kraigher, H. (2011). Genetic Differentiation of the Western Capercaillie

Highlights the Importance of South-Eastern Europe for Understanding the Species

Phylogeography. *PLoS ONE*, 6(8), e23602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023602>

Bensasson, D., Zhang, D.-X., Hartl, D. L., & Hewitt, G. M. (2001). Mitochondrial pseudogenes:

Evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(6), 314–321.

[https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(01\)02151-6](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(01)02151-6)

Brookfield, J. (1996). Population genetics. *Current Biology*.

[https://www.semanticscholar.org/paper/Population-genetics-](https://www.semanticscholar.org/paper/Population-genetics-Brookfield/723fd289bf69ea3d531ae84728a517ed8ef75a0b)

[Brookfield/723fd289bf69ea3d531ae84728a517ed8ef75a0b](https://www.semanticscholar.org/paper/Population-genetics-Brookfield/723fd289bf69ea3d531ae84728a517ed8ef75a0b)

Capercaillie one of Scotland's most endangered birds. (2022).

<https://www.bbc.co.uk/newsround/63071634>

Charlesworth, B. (2010). Molecular population genomics: A short history. *Genetics Research*,

92(5–6), 397–411. <https://doi.org/10.1017/S0016672310000522>

de Juana, Kirwan. (2012). Red-faced Mousebird (*Urocolius indicus*). *Handbook of the Birds of the World Alive*.

- Dowling, D. K. (2014). Evolutionary perspectives on the links between mitochondrial genotype and disease phenotype. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1840(4), 1393–1403.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.013>
- Edwards, S. V., Robin, V. V., Ferrand, N., & Moritz, C. (2022). The Evolution of Comparative Phylogeography: Putting the Geography (and More) into Comparative Population Genomics. *Genome Biology and Evolution*, 14(1), evab176.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evab176>
- Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress—PubMed*. (s.a.). Gauta 2024 m. gegužēs 24 d., <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11371642/>
- Frankham, R. (s.a.). *Genetic rescue of small inbred populations: Meta-analysis reveals large and consistent benefits of gene flow*. <https://doi.org/10.1111/mec.13139>
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., & Hurst, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: A reappraisal. *Molecular Ecology*, 18(22), 4541–4550.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x>
- Gemayel, R., Cho, J., Boeynaems, S., & Verstrepen, K. J. (2012). Beyond junk-variable tandem repeats as facilitators of rapid evolution of regulatory and coding sequences. *Genes*, 3(3), 461–480. <https://doi.org/10.3390/genes3030461>
- Genetic Diversity in Small Populations | IntechOpen*. (s.a.). Gauta 2024 m. gegužēs 24 d., <https://www.intechopen.com/chapters/61178>
- Harrison, Castell, C. J. O., Peter. (1998). *Bird Nests, Eggs and Nestlings of Britain and Europe—With North Africa and the Middle East* (2-asis leid.). HarperCollins.
- Katti, M. V., Sami-Subbu, R., Ranjekar, P. K., & Gupta, V. S. (2000). Amino acid repeat patterns in protein sequences: Their diversity and structural-functional implications. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 9(6), 1203–1209. <https://doi.org/10.1110/ps.9.6.1203>

- López-Cortegano, E., Vilas, A., Caballero, A., & García-Dorado, A. (2016). Estimation of genetic purging under competitive conditions. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 70(8), 1856–1870. <https://doi.org/10.1111/evo.12983>
- Lowry, D. B. (2010). Landscape evolutionary genomics. *Biology Letters*, 6(4), 502–504. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0969>
- McGowan, Madge, P., Steve. (2010). *Pheasants, Partridges & Grouse: Including buttonquails, sandgrouse and allies*. A&C Black.
- Meißner, R., Winter, S., Westerhüs, U., Sliwa, A., Greve, C., Bottriell, L. G., Bottriell, P., Fernandes, C. R., Vercammen, P., Hunter, L. T. B., Abramov, A. V., Khalatbari, L., Horin, P., Burger, P. A., & Prost, S. (2023). The potential and shortcomings of mitochondrial DNA analysis for cheetah conservation management. *Conservation Genetics (Print)*, 24(1), 125–136. <https://doi.org/10.1007/s10592-022-01483-1>
- Nel, Taylor, Ryan. (2003). Population Dynamics of the Wandering Albatross *Diomedea Exulans* at Marion Island: Longline Fishing and Environmental Influences. *African Journal of Marine Science* 25. <https://doi.org/DOI:10.2989/18142320309504039>
- P Hare, Nunney, Schwartz, Ruzzante, M., Leonard, Michael, Daniel. (2011). *Understanding and Estimating Effective Population Size for Practical Application in Marine Species Management*. <https://doi.org/DOI:10.1111/j.1523-1739.2010.01637.x>
- (PDF) *Origin, evolution and genome distribution of microsatellites*. (s.a.). Gauta 2024 m. gegužēs 23 d., https://www.researchgate.net/publication/247852463_Origin_evolution_and_genome_distribution_of_microsatellites
- Pérez-Jiménez, M., Besnard, G., Dorado, G., & Hernandez, P. (2013). Varietal tracing of virgin olive oils based on plastid DNA variation profiling. *PloS One*, 8(8), e70507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070507>

- Population dynamics of an endangered forest bird using mark–recapture models based on DNA-tagging* / Request PDF. (s.a.). Gauta 2024 m. gegužės 23 d., https://www.researchgate.net/publication/334718679_Population_dynamics_of_an_endangered_forest_bird_using_mark-recapture_models_based_on_DNA-tagging?_tp=eyJjb250ZXh0Ijp7ImZpcnN0UGFnZSI6InF1ZXN0aW9uIiwicGFnZSI6Il9kaXJlY3QifX0
- Population genetic diversity and fitness in multiple environments—PubMed*. (s.a.). Gauta 2024 m. gegužės 24 d., <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20609254/>
- Rašomavičius, V. (Sud.). (2021). *Lietuvos raudonoji knyga*. Lututė.
- Registry-Migration.Gbif.Org. (2023). *GBIF Backbone Taxonomy* [dataset]. <https://doi.org/10.15468/39OMEI>
- Sato, M., & Sato, K. (2011). Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6059), 1141–1144. <https://doi.org/10.1126/science.1210333>
- Sato, M., & Sato, K. (2013). Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1833(8), 1979–1984. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.010>
- Segelbacher, G., Paxton, R. J., Steinbrück, G., Trontelj, P., & Storch, I. (2000). Characterization of microsatellites in capercaillie *Tetrao urogallus* (AVES). *Molecular Ecology*, 9(11), 1934–1935. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.0090111934.x>
- Selective breeding and selection mapping using a novel wild-derived heterogeneous stock of mice revealed two closely-linked loci for tameness—PubMed*. (s.a.). Gauta 2024 m. gegužės 24 d., <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28676693/>
- Strzała, T., Kowalczyk, A., & Łukaszewicz, E. (2015). Reintroduction of the European Capercaillie from the Capercaillie Breeding Centre in Wisła Forest District: Genetic Assessments of

- Captive and Reintroduced Populations. *PLoS ONE*, *10*(12), e0145433.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145433>
- T. H. G. Ezard, J. M. J. Travis. (2006). *The impact of habitat loss and fragmentation on genetic drift and fixation time*. <https://doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.14778.x>
- Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., & Munhoz, C. de F. (2016). Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, *39*(3), 312–328.
<https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027>
- Wiesner, R. J., Rüegg, J. C., & Morano, I. (1992). Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: Copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *183*(2), 553–559. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(92\)90517-o](https://doi.org/10.1016/0006-291x(92)90517-o)
- Willebrand, Åhlén, T., Per-Arne. (2013). Survival of female capercaillie *Tetrao urogallus* in northern Sweden. *ResearchGate*. <https://doi.org/DOI:10.2981/13-025>
- Xu, J., Liu, L., Xu, Y., Chen, C., Rong, T., Ali, F., Zhou, S., Wu, F., Liu, Y., Wang, J., Cao, M., & Lu, Y. (2013). Development and characterization of simple sequence repeat markers providing genome-wide coverage and high resolution in maize. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, *20*(5), 497–509. <https://doi.org/10.1093/dnares/dst026>