

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Eva Rūkštelytė

**Slankų (*Scolopax rusticola*) populiacinės genetinės
struktūros analizė naudojant mitochondrinės DNR
genetinius žymenis**

Magistro baigiamasis darbas

Genetikos studijų programa

Darbo vadovas

Dr. (HP) Dalius Butkauskas

Darbas atliktas

Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Gamtos
tyrimų centro Molekulinės ekologijos
laboratorijoje

Vilnius, 2026

Turinys

Ivadas	4
1. Literatūros apžvalga	6
1.1. Slanka (<i>Scolopax rusticola</i>)	6
1.1.1 Slankos mokslinė klasifikacija	6
1.1.2 Slankos biologinės savybės	6
1.1.3 Slankos ekologinės savybės	8
1.1.4 Slankos paplitimas	8
1.2. Populiacinė genetika	9
1.2.1. Populiacinės genetikos samprata	9
1.2.2. Genetinė struktūra	9
1.2.3. Mutacijos	9
1.2.4. Genų srautas	10
1.2.5. Genų dreifas	11
1.2.6. Natūrali atranka	11
1.2.7. Molekuliniai metodai, naudojami populiacinėje genetikoje	12
1.2.8. Genetinių duomenų analizė ir vizualizacija	13
1.3. Mitochondrinė DNR	15
1.3.1. Mitochondrija ir mitochondrinės DNR sandara	15
1.3.2. Mitochondrinės DNR savybės	16
1.3.3. Mitochondrinės DNR žymenys	16
1.3.4. Mitochondrinės DNR kontrolinis regionas	17
1.3.5. Mitochondrinės DNR citochromo b regionas	18
1.3.6. Mitochondrinės DNR ribotumas	18
2. Medžiagos ir metodai	19
2.1 Medžiagos	19
2.1.1 Tiriamoji medžiaga	19
2.1.2 Reagentai	19
2.1.3 Laboratorinė įranga	21
2.2 Metodai	21
2.2.1 DNR išskyrimas	22
2.2.2 Polimerazės grandininė reakcija	22
2.2.3 Elektroforezė	23
2.2.4 Sekoskaita ir duomenų apdorojimas	23

3. Rezultatai	24
3.1 DNR koncentracijos nustatymas	24
3.2 DNR amplifikacijos rezultatai	24
3.3 Sekų sulyginimas bei filogenetinė analizė	26
3.4 Polimorfinių vietų analizė	28
3.5 Haplotipų tinklo sudarymas	30
4. Rezultatų aptarimas	32
Išvados	34
Asmeninis indėlis	35
Publikacijų sąrašas ir mokslinės konferencijos	36
Padėka	37
Santrauka	38
Abstract	39
Literatūros sąrašas	40
Priedai	46

Įvadas

Populiacijų genetinė struktūra yra svarbus populiacinės genetikos tyrimų objektas, leidžiantis įvertinti genetinių skirtumų pasiskirstymą tarp individų ir populiacijų. Ji susiformuoja veikiant įvairiems evoliuciniams veiksniams, tokiems kaip genų srautas, genetinis dreifas ar natūrali atranka, todėl jos analizė padeda geriau suprasti populiacijų tarpusavio ryšius bei migracijos procesus. Paukščių populiacijose genetinę struktūrą ypač veikia ekologiniai ir biologiniai veiksniai, pavyzdžiui, paplitimo arealo dydis ar reprodukcinės savybės. 2020 metais Stange ir jo kolegų atliktame tyrime buvo nustatyta, kad platesnį arealą užimančios populiacijos dažniausiai pasižymi didesne genetinė variacija, kuri gali turėti įtakos ir jų genetinės struktūros ypatumams.

Slanka (*Scolopax rusticola*) yra viena iš dažniausiai migruojančių ir medžiojamų paukščių rūšių, priklausanti tilvikinių (Scolopacidae) šeimai. Ši rūšis paplitusi Europoje ir kai kuriose Azijos teritorijose. Lietuvoje perinčios slankos, atšalus orams, migruoja į pietinius Europos regionus, o dalis jų žiemoja Pirėnų pusiasalyje (Jusys et al., 2022). Nors šiuo metu Europos slankų populiacija laikoma stabilia ir siekia apie 15-20 milijonų individų, siekiant užtikrinti tvarų jos valdymą būtini empiriniai tyrimai, leidžiantys įvertinti populiacijų būklę ir jų tarpusavio ryšius (Ferrand et al., 2001).

Vienas iš efektyviausių būdų tirti populiacijų ypatumus yra genetinių žymenų taikymas. Tai specifinės DNR sekos, naudojamos rūšių identifikavimui, genetinės įvairovės bei paveldimų požymių analizei. Jie plačiai taikomi tiriant rūšių evoliuciją, migraciją ir populiacijų genetinę struktūrą (Boopathi, 2013). Tarp tokių žymenų svarbią vietą užima mitochondrinė DNR (mtDNR), kuri dėl savo savybių yra plačiai naudojama tiriant migracijos procesus, populiacijų diferenciaciją ir filogeografinius modelius. Siekiant kompensuoti žinių spragą slankų genetinės įvairovės tyrimuose šiame darbe buvo pasirinkta nustatyti šių paslaptinių paukščių, reprezentuojančių Lietuvos, Ispanijos ir Baltarusijos slankų populiacijas, genetinės struktūros ypatumus, pasirenkant šiam tikslui tinkamą genetinį žymenį. Būtent dėl mitochondrinės DNR informatyvumo šiame darbe pasirinktas jos kontrolinis regionas, kuris pasižymi dideliu variabilumu tarp individų, todėl yra plačiai naudojamas tokio pobūdžio tyrimuose.

Ankstesnis slankų populiacijos tyrimas parodė, kad skirtingi genetiniai žymenys gali pateikti nevienodus rezultatus. Pavyzdžiui, italų mokslininkų atliktame tyrime, analizuojant žiemojančių slankų populiacijas, buvo naudoti mitochondrinės DNR citochromo b genas (cyt b) ir branduolinis β -fibrinogeno genas. Nustatyta, kad naudojant cyt b buvo išskirtos dvi haplogrupės, tuo tarpu taikant branduolinį žymenį tokia struktūra nebuvo aptikta (Trucchi et al., 2011).

Atsižvelgiant į tai, šiame darbe buvo siekiama įvertinti mitochondrinės DNR kontrolinio regiono tinkamumą tiriant slankų populiacinę genetinę struktūrą ir migracinius ryšius, taip pat

palyginti gautus rezultatus su cyt b pagrindu atliktais tyrimais skirtingose slankų populiacijose Europoje.

Darbo tikslas:

Ištirti slankų (*Scolopax rusticola*) populiacinės genetinės struktūros ypatumus naudojant mtDNR genetinius žymenis ir įvertinti genetinę įvairovę bei galimus populiacijų diferenciacijos modelius.

Darbo uždaviniai:

1. Atlikti slankų, sumedžiotų Ispanijos, Lietuvos ir Baltijos teritorijose, mitochondrinės DNR kontrolinio regiono sekoskaitą.
2. Išanalizuoti nusekvenuotų sekų duomenis atlikus sekų suliginimus bei įvertinti kontrolinio regiono informatyvumą.
3. Atlikti filogenetinių medžių konstravimą bei analizę.
4. Nustatyti haplotipų pasiskirstymą haplogrupėse bei nubraižyti haplotipų tinklus.
5. Nustatyti slankų, sumedžiotų trijuose tiriamuose regionuose, populiacinę genetinę struktūrą bei palyginti su italų mokslininkų gautais duomenimis.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Slanka (*Scolopax rusticola*)

1.1.1 Slankos mokslinė klasifikacija

Karalystė: Animalia (Gyvūnai)

Tipas: Chordata (Chordiniai)

Klasė: Aves (Paukščiai)

Būrys: Charadriiformes (Sėjikiniai paukščiai)

Šeima: Scolopacidae (Tilvikiniai)

Gentis: *Scolopax* (Slankos)

Rūšis: *Scolopax rusticola* (Slanka)

Giminingos rūšys, priklausančios slankų genčiai: *S. bukidnonensis*, *S. celebensis*, *S. minor*, *S. mira*, *S. rochussenii*, *S. rosenbergii*, *S. saturata*.

1.1.2 Slankos biologinės savybės

Slanka (lot. *Scolopax rusticola*) yra vidutinio dydžio paukštis, priklausantis tilvikinių šeimai. Slankos (1.1 pav.) kūno masė paprastai svyruoja nuo 144 g iki 420 g, kūno ilgis siekia apie 33-35 cm., o išskleistų sparnų plotis dažniausiai būna apie 55-65 cm. Šių paukščių plunksnų spalva yra maskuojanti, vyrauja įvairūs rudos, rusvos ir pilkšvos spalvos atspalviai su tamsesnėmis dėmėmis ir juostomis. Tokia spalva padeda paukščiams susiliesti su miško paklotės aplinka ir apsisaugoti nuo plėšrūnų. Viršutinė kūno dalis paprastai yra tamsesnė nei apatinė, pastarojoje dalyje dažnai matomos skersinės juostos. Ant viršugalvio taip pat galima pastebėti kelias tamsias juostas (Hoyo et al., 1996). Vienas iš ryškiausių slankos morfologinių požymių ilgas ir jautrus snapas, kurio gale daug nervinių receptorių, leidžiančių aptikti dirvožemyje esančius bestuburius. Toks prisitaikymas svarbus ieškant pagrindinio maisto šaltinio – sliekų. Be to, slankų akys yra išsidėsčiusios aukštai galvos šonuose, todėl jos turi labai platų matymo lauką ir gali stebėti aplinką beveik 360° kampu (Martin, 1994).



1.1 pav. Slanka (*Scolopax rusticola*). Nuotrauka paimta iš <https://ebird.org/species/eurwoo>

Slankos dažniausiai aktyvios prieblandoje bei nakties metu. Dieną jos paprastai slepiasi tankioje miško augmenijoje arba tarp nukritusių lapų, kur dėl maskuojančios kūno spalvos tampa sunkiai pastebimos. Vakare ir naktį jos išskrenda maitintis į atviresnes vietas, tokias kaip pievos ar laukų pakraščiai (Duriez et al., 2005).

Didžiąją slankų maisto raciono dalį sudaro dirvožemyje gyvenantys bestuburiai gyvūnai. Daugiausiai jos minta sliekais, tačiau taip pat gali maitintis vabzdžiais, jų lervomis, vorais, vabalais ir kitais smulkiais bestuburiais. Kartais į racioną patenka ir augalinės kilmės maisto, pavyzdžiui, sėklų ar jaunų augalų dalių. Slankos minta pavieniui (Hoyo et al., 1996).

Veisimosi laikotarpiu slankų patinams būdingas specifinis elgesys, vadinamas traukimo skrydžiu (angl. *roding*). Jo metu patinai vakarais lėtai skraido virš miško pakraščių ar proskynų ir skleidžia savitus garsus, taip ieškodami potencialių patelių. Šiai rūšiai būdinga poligamiška poravimosi sistema, todėl patinai gali poruotis su keliomis patelėmis. Lizdą įrengia tik patelė. Paprastai tai yra negili įduba žemėje, išklota lapais ar kita augaline medžiaga. Dažniausiai per vieną dėjimą padedami 3-4 kiaušiniai, o jų inkubacija trunka apie 21-24 dienas. Išsiritę jaunikliai lizdą palieka po poros savaičių. Perėjimo laikotarpis trunka apytiksliai nuo balandžio iki birželio mėnesio (Beaman & Madge, 1998).

Slankos yra migruojantys paukščiai. Dauguma Šiaurės Europos slankų populiacijos atstovų žiemoti migruoja į Vakarų ir Pietų Europoje esančius regionus, o pavasarį grįžta į veisimosi teritorijas. Jau vasario mėnesį prasideda slankų pavasarinė migracija, kad iki perėjimo pradžios būtų pasiektos veisimosi vietos (Beaman & Madge, 1998). Migracija vyksta nakties metu, o kuriose vietose bus žiemojama dažnai lemia klimato sąlygos ir maisto prieinamumas (Duriez et al., 2005).

1.1.3 Slankos ekologinės savybės

Slankos įprastai aptinkamos miškingose vietovėse, ypač drėgnuose lapuočių ir mišriuose miškuose. Šiems paukščiams svarbi tanki miško augmenija ir minkštas, drėgnas dirvožemis, kuriame maistas yra lengviau prieinamas. Slankos taip pat gali būti aptinkamos miško pakraščiuose, kirtavietėse ar netoli pievų, kur jos dažnai maitinasi nakties metu. Tokios buveinės suteikia tinkamas sąlygas tiek slėptis dienos metu, tiek ieškoti maisto (Hoodless & Hirons, 2007).

Slankų populiacijai didelę įtaką gali turėti buveinių pokyčiai ir žmogaus veikla. Miškų kirtimai, intensyvus žemės ūkis ar buveinių fragmentacija gali sumažinti tinkamų gyvenamųjų vietų kiekį. Tačiau kai kuriais atvejais mozaikinė kraštovaizdžio struktūra, kurioje derinasi miškai, pievos ir krūmynai, gali sudaryti palankias sąlygas šiai rūšiai. Dėl šių priežasčių slankų populiacijos pokyčiai dažnai siejami su kraštovaizdžio struktūros ir buveinių kokybės kaita (Ferrand et al., 2006).

1.1.4 Slankos paplitimas

Slanka yra Europoje paplitusi rūšis, aptinkama didelėje Palearktikos regiono dalyje. Šie paukščiai yra aptinkami ne tik visoje Europoje, bet taip pat ir kai kuriuose vidurio Azijos regionuose bei Šiaurės Afrikos dalyje (prie Viduržemio jūros). Dėl plataus paplitimo ši rūšis laikoma viena iš labiausiai paplitusių tilvikinių paukščių rūšių Europoje (Tucker, 1995).

Didžiausios perinčios slankų populiacijos aptinkamos Rytų ir Šiaurės Europoje, ypač Europinės Rusijos dalyje, Skandinavijos šalyse ir Baltijos regione (Beaman & Madge, 1998). Vakarinėje ir pietinėje Europos dalyje šios rūšies perėjimo vietos dažniausiai yra retesnės ir labiau fragmentuotos, nes tinkamų buveinių ten yra mažiau (Ferrand et al., 2006).

Lietuvoje slanka yra plačiai paplitusi rūšis, aptinkama visoje šalies teritorijoje. Dauguma Lietuvoje gyvenančių slankų yra migruojantys paukščiai, todėl rudenį jos išskrenda į šiltesnes Europos dalis. Žiemojimo atvejai Lietuvoje užfiksuoti labai retai, kuomet būdavo ne tokios šaltos žiemos. Paprastai slankos Lietuvoje pastebimos nuo kovo iki lapkričio mėnesio. Kiekvienais metais daugiausiai slankų yra stebima Klaipėdos ir Utenos apskrityse. Migracijos laikotarpiu šios rūšies paukščiai dažnai aptinkami atviresnėse vietose – pievose, ganyklose, pelkėtose teritorijose ar netoli vandens telkinių, kur ieško maisto. Veisimosi ir perėjimo laikotarpiu slankos dažniausiai randamos drėgnuose lapuočių ar mišriuose miškuose (Jusys et al., 2022).

1.2. Populiacinė genetika

1.2.1. Populiacinės genetikos samprata

Populiacinė genetika yra evoliucinės biologijos šaka, nagrinėjanti genetinės įvairovės pasiskirstymą populiacijose ir veiksnius, kurie lemia šios įvairovės pokyčius laikui bėgant. Populiacinės genetikos tyrimai leidžia geriau suprasti rūšių evoliucinius procesus, genetinę adaptaciją ir populiacijų diferenciaciją skirtingose geografinėse teritorijose (Kanaka et al., 2023).

1.2.2. Genetinė struktūra

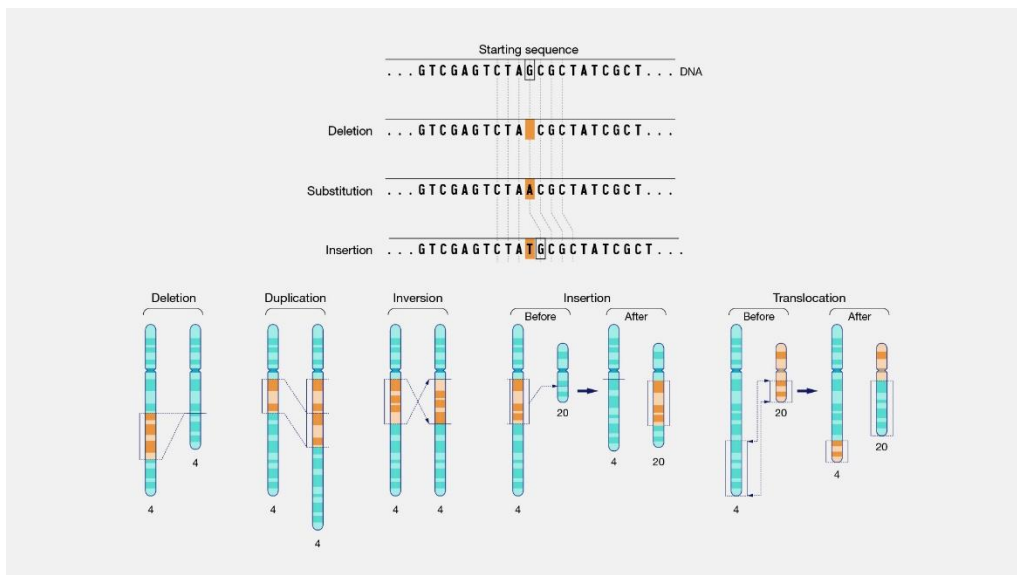
Vienas svarbiausių populiacinės genetikos tyrimo objektų yra populiacijų genetinė struktūra, apibūdinanti genetinės įvairovės pasiskirstymą tarp skirtingų tos pačios rūšies populiacijų (vidurūšinė įvairovė). Genetinės struktūros analizavimas leidžia nustatyti, ar tiriamos populiacijos yra genetiškai panašios, ar diferencijuotos (Allendorf & Luikart, 2006). Genetinė struktūra formuojasi dėl įvairių evoliucinių ir ekologinių veiksnių, tokių kaip geografinė izoliacija, buveinių fragmentacija, migracija, istorinių aplinkybių vedinių pokyčių ir kt (Slatkin, 1987).

Populiacinės genetikos pagrindas yra alelių dažnių analizė bei jų kitimo procesai, kuriuos lemia mutacijos, genetinis dreifas, natūrali atranka ir genų srautas (Hartl & Clark, 2007).

1.2.3. Mutacijos

Mutacijos yra paveldimi genetinės medžiagos pokyčiai, atsirandantys DNR sekoje. Mutacijos gali atsirasti tiek dėl DNR replikacijos klaidų, tiek dėl įvairių išorinių veiksnių, tokių kaip radiacija, cheminės medžiagos ar kiti aplinkos stresoriai (Baer et al., 2007). Šie genetiniai pokyčiai gali pasireikšti skirtingais lygmenimis – nuo vieno nukleotido pakitimų iki didesnių chromosominių reorganizacijų (Lynch et al., 2016). Tik tos mutacijos, kurios įvyksta lytinėse ląstelėse, gali būti perduodamos palikuonims, taip darant įtaką genetinės variacijos atsiradimui populiacijoje (Gaur, 2017).

Mutacijų pagrindiniai tipai yra nukleotidų įterpimai (insercijos) ir iškritimai (delecijos) bei didesni genomo struktūros pokyčiai, tokie kaip chromosomų inversijos, translokacijos ar duplikacijos (1.2 pav.). Dažniausiai populiacinėje genetikoje nagrinėjamos taškinės mutacijos, kuomet pasikeičia vienas nukleotidas DNR sekoje. Tokie pokyčiai, įvykę lytinėse ląstelėse, gali sukelti naujų alelių atsiradimą ir taip didinti genetinę įvairovę populiacijose (Hartl & Clark, 2007). Nors dauguma mutacijų yra neutralios arba žalingos organizmui, kai kurios jų gali suteikti selekcinį pranašumą ir būti palaikomos natūralios atrankos metu (Baer et al., 2007).



1.2 pav. Pavaizduoti pasitaikantys mutacijų tipai: vieno nukleotido pasikeitimai (A) ir dalies chromosominio segmento pokyčiai (B).

<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Mutation>

Molekulinės genetikos tyrimuose mutacijos dažnai naudojamos kaip genetiniai žymenys, leidžiantys analizuoti populiacijų genetinę struktūrą ir evoliucinę istoriją. Pavyzdžiui, mitochondrinės DNR sekose aptikti nukleotidų pakitimai gali būti naudojami genetiniams ryšiams tarp populiacijų nustatyti. Tokie genetiniai skirtumai gali padėti įvertinti populiacijų diferenciaciją, migracijos procesus bei istorinius populiacijų pokyčius (Ballard & Whitlock, 2004).

1.2.4. Genų srautas

Vienas iš svarbiausių veiksnių, lemiančių genetinės struktūros formavimąsi, yra genų srautas. Jis vyksta kai tos pačios rūšies individai migruoja tarp skirtingose vietovėse esančių populiacijų, kryžmindamiesi su ne toje pačioje populiacijoje esančiais individais ir perduodami genetinę informaciją palikuonims (Whitlock & McCauley, 1999).

Genų srautas atlieka svarbų vaidmenį palaikant genetinę įvairovę populiacijose. Migracija tarp populiacijų gali įnešti naujų alelių ir taip padidinti genetinę variaciją vietinėse populiacijose. Dėl šios priežasties genų srautas dažnai veikia kaip procesas, mažinantis genetinę diferenciaciją tarp populiacijų ir palaikantis jų genetinį panašumą (Slatkin, 1987). Tačiau kai migracija tarp populiacijų yra ribota, genetiniai skirtumai gali didėti dėl genetinio dreifo ar natūralios atrankos poveikio (Hartl & Clark, 2007).

1.2.5. Genų dreifas

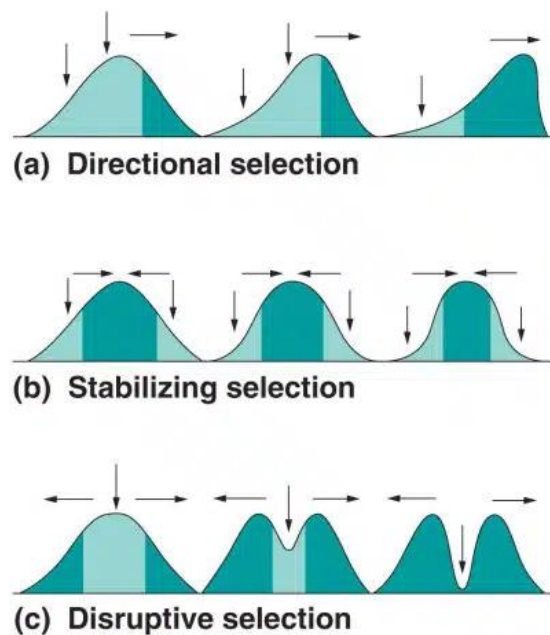
Be genų srauto, genetinę struktūrą taip pat stipriai veikia genetinis dreifas – atsitiktiniai alelių dažnių pokyčiai, kurie ypač pasireiškia mažose ar izoliuotose populiacijose (Charlesworth, 2009). Atsitiktiniai genetiniai procesai gali lemti tiek tam tikrų alelių dažnio padidėjimą, tiek visišką jų išnykimą populiacijoje. Kadangi mažose populiacijose atsitiktinumą įtaka yra didesnė, genetinis dreifas čia turi ryškesnę poveikį bendram genetinės įvairovės lygiui. Dėl genetinio dreifo ilgainiui mažėja genetinė įvairovė populiacijos viduje ir didėja genetinė diferenciacija tarp skirtingų populiacijų (Hartl & Clark, 2007).

Genetinio dreifo poveikis gali dar labiau sustiprėti staiga sumažėjus populiacijos dydžiui, pavyzdžiui, „butelio kaklelio“ (angl. bottleneck) arba „įkūrėjo“ efekto (angl. founder effect) atvejais. Tokiose situacijose nedidelis individų skaičius perduoda tik dalį pradinės genetinės įvairovės, todėl populiacijos genetinė struktūra gali greitai pakisti (Hundertmark et al., 2010).

1.2.6. Natūrali atranka

Natūrali atranka yra vienas pagrindinių evoliucinių procesų, lemiantis alelių dažnių pokyčius populiacijose dėl individų skirtingo išgyvenamumo ir reprodukcinės sėkmės. Ji vyksta tada, kai tam tikri paveldimi požymiai suteikia individams pranašumą konkrečiomis aplinkos sąlygomis, todėl keičiantis aplinkos sąlygoms tokie požymiai populiacijoje tampa lemiami organizmų išgyvenamumui (Hartl & Clark, 2007).

Natūrali atranka paveikia fenotipą, tačiau jos pasekmės atsispindi genotipų ir alelių dažnių pokyčiuose. Priklausomai nuo aplinkos sąlygų ir selekcinio spaudimo pobūdžio, gali būti išskiriamos skirtingos natūralios atrankos formos: kryptingoji (angl. *directional*), stabilizuojanti (angl. *stabilizing*) ir skaldančioji (angl. *disruptive*) atranka (1.3 pav.). Kryptingoji atranka skatina vieno fenotipo dominavimą, stabilizuojanti – palaiko vidutinį fenotipą, o skaldančioji – didina kraštutinių fenotipų dažnį populiacijoje (Ayala, 2026).



1.3 pav. Natūralios atrankos tipai: (a) kryptingoji, (b) stabilizuojanti ir (c) skaldančioji. <https://schoolworkhelper.net/evolution-ecology-natural-selection-gene-flow-speciation-drift/>

Natūrali atranka taip pat gali veikti skirtingu intensyvumu priklausomai nuo populiacijos genetinės įvairovės ir aplinkos pokyčių. Esant didesnei genetinei įvairovei, populiacija turi daugiau galimybių prisitaikyti prie kintančių sąlygų, todėl atrankos poveikis gali būti efektyvesnis (Barrett & Schluter, 2008).

Svarbu, kad natūrali atranka dažnai vyksta kartu su kitais evoliuciniais veiksniais, tokiais kaip genų dreifas ar genų srautas. Šių procesų sąveika lemia bendrą populiacijų genetinės struktūros formavimąsi ir jų evoliucinę dinamiką (Hartl & Clark, 2007).

1.2.7. Molekuliniai metodai, naudojami populiacinėje genetikoje

Pastaraisiais dešimtmečiais populiacinės genetikos tyrimai labai išsiplėtė dėl sparčiai tobulėjančių molekulinų ir genominių metodų. Naujos sekoskaitos technologijos leidžia analizuoti didelius genetinių duomenų kiekius ir tiksliau nustatyti populiacijų struktūrą, migracijos modelius bei evoliucinę istoriją (Hohenlohe et al., 2020). Populiacinė genetika tapo svarbia disciplina tiek evoliucinėje biologijoje, tiek gamtos apsaugos tyrimuose, nes genetinė informacija gali būti naudojama vertinant populiacijų gyvybingumą, genetinės įvairovės lygį ir galimus izoliacijos procesus (Funk et al., 2019).

Populiacinėje genetikoje plačiai taikomi įvairūs molekuliniai metodai, leidžiantys analizuoti genetinę informaciją skirtingais lygmenimis. Vienas pagrindinių metodų yra polimerazės grandininė

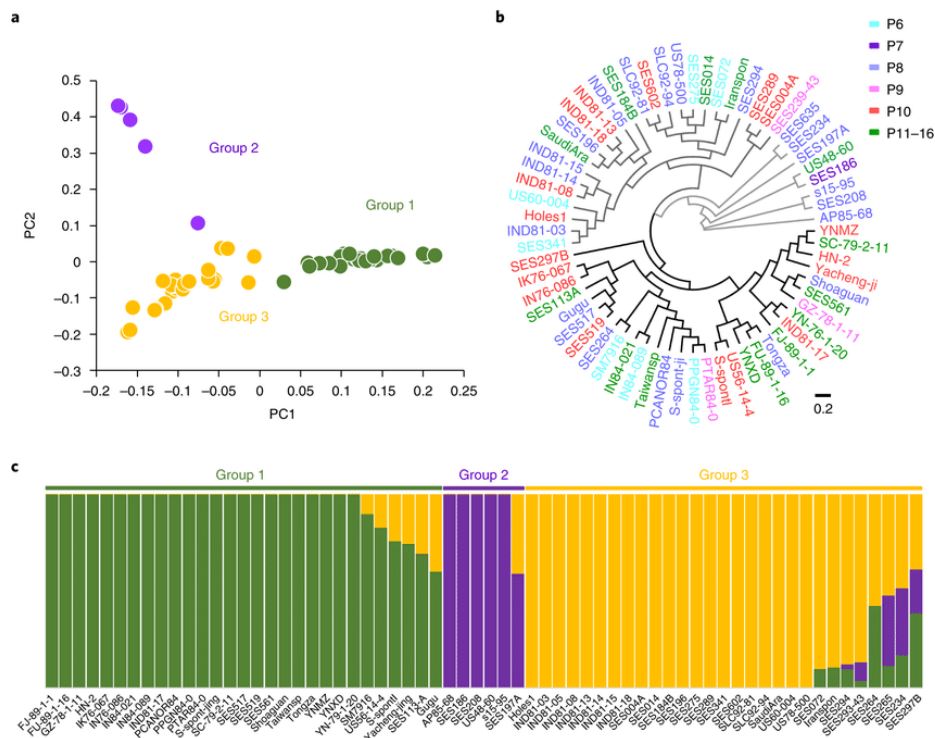
reakcija (angl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), kuri naudojama specifiniams DNR fragmentams amplifikuoti ir paruošti tolimesnei analizei. Taip pat plačiai taikoma DNR sekoskaita, leidžianti nustatyti nukleotidų seką ir identifikuoti genetinius skirtumus tarp individų ar populiacijų (Hohenlohe et al., 2020). Pastaraisiais dešimtmečiais ypač išplito naujos kartos sekoskaitos (angl. *next-generation sequencing*) technologijos, kurios suteikia galimybę analizuoti didelius genetinių duomenų kiekius ir tiksliau vertinti populiacijų struktūrą bei evoliucinius procesus (Metzker, 2010).

Šioms metodikoms yra taikomi įvairūs molekuliniai žymenys, kurie leidžia įvertinti genetinę įvairovę ir populiacijų struktūrą. Dažniausiai naudojami organizmų mitochondrinė DNR (mtDNR), mikrosatelitai bei vieno nukleotido polimorfizmai (angl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) (Awise, 2000). mtDNR yra plačiai naudojama populiaciniuose tyrimuose dėl savo pagrindinių savybių – ji paveldima motiniškai, neturi rekombinacijos ir pasižymi palyginti dideliu mutacijų dažniu. Dėl šių savybių mtDNR yra tinkama tiek filogeografiniams tyrimams ir populiacijų istorijos rekonstrukcijai, tiek genetinės įvairovės, populiacijų diferenciacijos, migracijos modelių bei evoliucinių ryšių analizei (Ballard & Whitlock, 2004).

Be mtDNR, populiacinėje genetikoje plačiai taikomi branduoliniai žymenys, tokie kaip mikrosatelitai ir SNP. Mikrosatelitai yra trumpų pasikartojančių DNR sekų regionai, pasižymintys dideliu mutacijų dažniu ir polimorfizmu, todėl yra ypač naudingi tiriant genetinę įvairovę, populiacijų diferenciaciją bei individų giminystės ryšius (Selkoe & Toonen, 2006). Tuo tarpu SNP yra vieno nukleotido skirtumai aptinkami DNR sekoje, plačiai paplitę visame genome. Nors kiekvienas SNP paprastai yra mažiau informatyvus nei mikrosatelitai, jų gausa ir galimybė analizuoti didelius duomenų kiekius, ypač taikant naujos kartos sekoskaitos technologijas, leidžia tiksliai įvertinti populiacijų struktūrą, genetinę įvairovę ir galimus migracijos modelius (Seeb et al., 2011).

1.2.8. Genetinių duomenų analizė ir vizualizacija

Populiacinėje genetikoje genetiniai duomenys analizuojami taikant įvairius statistinius ir bioinformatinius metodus, leidžiančius įvertinti genetinę įvairovę bei populiacijų struktūrą (1.4 pav.). Dažniausiai apskaičiuojami tokie rodikliai kaip heterozigotiškumas, alelių įvairovė ar haplotipų skaičius, taip pat vertinama genetinė diferenciacija tarp populiacijų ir t.t. (Allendorf et al., 2012).



1.4 pav. Populiacijų genetinės struktūros ir filogenetinių ryšių analizė *S. spontaneum* rūšies individų: (a) PCA, (b) filogenetinis medis ir (c) populiacijų struktūros (ADMIXTURE) diagrama (Zhang et al., 2018).

Populiacijų struktūrai tirti plačiai naudojami modeliais pagrįsti metodai, pavyzdžiui, Bajeso (angl. *Bayesian*) klasterizacijos algoritmai, kurie individus suskirsto į genetines grupes pagal jų panašumą ir leidžia įvertinti priklausomybę skirtingoms populiacijoms. Šių analizių rezultatai dažniausiai pateikiami grafiškai, vaizduojant individų genetinę sudėtį ir galimus genetinio maišymosi atvejus tarp populiacijų (Pritchard et al., 2000). Taip pat yra taikomi daugiamaatės analizės metodai, tokie kaip pagrindinių komponentų analizė (angl. *Principal Component Analysis*, PCA), kurie padeda supaprastinti genetinius duomenis ir vizualiai palyginti individus ar populiacijas, išryškinant jų tarpusavio genetinius skirtumus (Jombart et al., 2010).

Genetiniai ryšiai taip pat dažnai vaizduojami naudojant haplotipų tinklus ir filogenetinius medžius. Haplotipų tinklai leidžia įvertinti ryšius tarp haplotipų, jų pasiskirstymą populiacijose bei apskaičiuoti mutacinius žingsnius tarp skirtingų haplotipų, o filogenetiniai medžiai atskleidžia evoliucinius ryšius tarp individų, populiacijų ar rūšių bei jų kilmės dėsningumus. Šie metodai papildo statistines analizes ir suteikia galimybę aiškiau interpretuoti genetinių duomenų struktūrą bei populiacijų tarpusavio ryšius (Huson & Bryant, 2006).

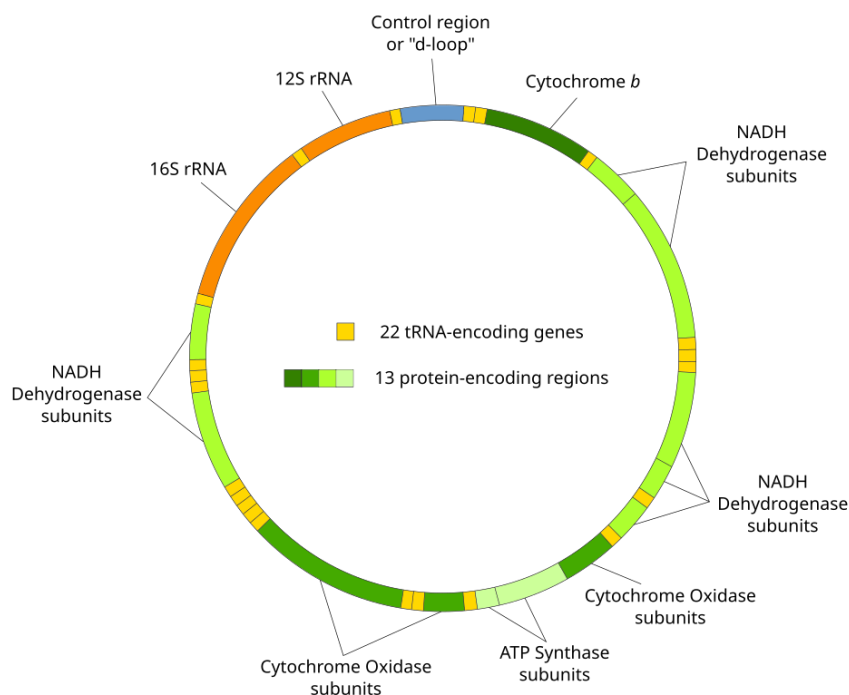
1.3. Mitochondrinė DNR

1.3.1. Mitochondrija ir mitochondrinės DNR sandara

Mitochondrijos yra sferinės formos organelės, lokalizuotos ląstelės citoplazmoje. Jas sudaro dviguba membrana, kuri mitochondriją padalija į dvi pagrindines dalis: tarpmembraninę erdvę, esančią tarp išorinės ir vidinės membranų, ir matricą, užpildančią vidinę membraną. Būtent matricoje aptinkama mtDNR (Chial et al., 2008).

Manoma, kad mitochondrijos evoliucionavo iš bakterijų, o evoliucijos eigoje jų genomas sumažėjo, nes dalis genetinės medžiagos numigravo į branduolį (Wan et al., 2004). Šiuo metu žinoma, kad mitochondrijų genomas yra žiedo formos ir sudarytas iš maždaug 16-17 tūkstančių DNR bazių porų.

Mitochondrijų genome identifikuojami 37 genai: 13 iš jų koduoja baltymus, 22 – transportinę RNR (tRNR), o likę 2 – ribosominę RNR (rRNR) (1.5 pav.). Mitochondrinės DNR koduojami baltymai yra fermentinių kompleksų subvienetai, dalyvaujantys oksidacinio fosforilinimo procese. Nekoduojančios sekos sudaro tik nedidelę genomo dalį – apie 3 % (Chial et al., 2008).



1.5 pav. Žmogaus mtDNR struktūra. Pavaizduotas žiedo formos mitochondrijų genomas, kuriame išsidėstę baltymus koduojantys genai, tRNR ir rRNR genai bei kontrolinis regionas (D-loop). https://isogg.org/wiki/Mitochondrial_DNA

1.3.2. Mitochondrinės DNR savybės

Mitochondrinė DNR pasižymi išskirtinėmis savybėmis, tokiomis kaip didelis kopijų skaičius ląstelėje, motininis paveldėjimas ir santykinai aukštas mutacijų dažnis, todėl ji yra plačiai naudojama įvairiose mokslo srityse. Antropologinėje genetikoje mtDNR taikoma analizuojant genetinės variacijos geografinį pasiskirstymą, tiriant populiacijų plitimą, migracijas ir genų srauto modelius. Taip pat mtDNR plačiai naudojama teismo medicinoje žmogaus palaikų identifikavimui. Dėl didelio polimorfizmo ir mutacijų dažnio mtDNR teikia daug informacijos apie genetinį kintamumą. Taip pat vis daugiau tyrimų rodo, kad kai kurios mtDNR mutacijos gali būti susijusios su įvairiomis žmogaus patologijomis (Atig et al., 2009).

Populiacinėje genetikoje mtDNR ypač vertinga dėl savo savybių, leidžiančių analizuoti genetinę įvairovę ir populiacijų struktūrą. Dėl motininio paveldėjimo ir rekombinacijos nebuvimo, mtDNR atspindi vienos linijos genetinę istoriją, todėl gali būti naudojama populiacijų kilmei bei jų tarpusavio ryšiams tirti. Didelis mutacijų dažnis leidžia aptikti net ir nedidelius genetinius skirtumus tarp populiacijų, dėl šios priežasties mtDNR yra laikoma viena iš informatyviausių genetinių žymenų tiriant migracijos procesus, populiacijų diferenciaciją ir filogeografinius modelius (Ballard & Whitlock, 2004).

Šiems tyrimams dažniausiai pasirenkami konkretūs mtDNR regionai, kurie veikia kaip genetiniai žymenys. Skirtingi mtDNR fragmentai pasižymi nevienodu kintamumo lygiu, todėl gali būti taikomi skirtingo masto genetiniams tyrimams – nuo artimų populiacijų palyginimo iki platesnių evoliucinių ryšių analizės (Avice, 2000).

1.3.3. Mitochondrinės DNR žymenys

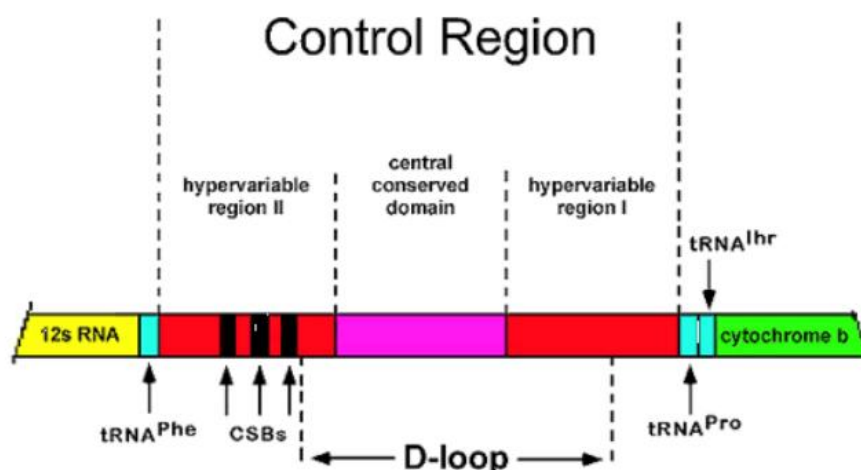
Mitochondrinė DNR yra suskirstyta į skirtingus regionus, kurie pasižymi skirtingu kintamumo lygiu, todėl gali būti naudojami kaip genetiniai žymenys įvairaus masto tyrimuose. Dėl skirtingų evoliucijos greičių kai kurie mtDNR fragmentai yra labiau konservatyvūs, o kiti – variabilūs, todėl jų pasirinkimas priklauso nuo tiriamo genetinio lygmens, pavyzdžiui, mtDNR randami 12S ir 16S rRNR yra santykinai konservatyvūs ir dažniausiai naudojami tiriant filogenetinius ryšius aukštesniuose taksoniniuose lygmenyse, pavyzdžiui, tarp genčių ar šeimų (Wan et al., 2004). Baltymus koduojantys genai, ypač citochromo oksidazės I (COI) regionas, pasižymi didesniu kintamumu ir yra plačiai taikomi rūšių atpažinimui bei genetinės įvairovės vertinimui. COI regionas yra parankus dėl universalių pradmenų naudojimo galimybės, leidžiančios tirti tiek vidurūšinę, tiek tarprūšinę genetinę įvairovę (Allan et al., 2010).

Mitochondrinėje DNR išskiriami keli regionai, kurie dėl skirtingo kintamumo yra naudojami kaip genetiniai žymenys populiacinėje genetikoje. Jų pasirinkimas priklauso nuo tyrimo tikslų, kadangi skirtingi mtDNR fragmentai suteikia skirtingą informacijos kiekį apie genetinę įvairovę, populiacijų struktūrą ir evoliucinius ryšius. Dažniausiai analizuojami tiek nekoduojantys, tiek baltymus koduojantys mtDNR regionai, leidžiantys tirti genetinius skirtumus įvairiais lygmenimis (Avis, 2000).

1.3.4. Mitochondrinės DNR kontrolinis regionas

Mitochondrinės DNR kontrolinis regionas yra pagrindinė baltymų nekoduojanti sritis, randama gyvūnų mtDNR (Wan et al., 2004). Regiono ilgis paprastai siekia apie 1600 bazių porų. Jis dar vadinamas D-kilpos (angl. *D-loop*) regionu dėl jame susidarančios specifinės DNR struktūros. Kontrolinis regionas svarbus tiriant organizmų, ypač stuburinių gyvūnų, evoliuciją. Jame taip pat randami promotoriai, dalyvaujantys RNR transkripcijos inicijavime abiejose mitochondrinės DNR grandinėse (Fish et al., 2004).

Kontrolinis regionas skirstomas į tris dalis: du hipervariabiliuosius ir vieną konservatyvų domeną (1.6 pav.). Hipervariabilieji domenai pasižymi greitu evoliucijos tempu, todėl dažnai pritaikomas tiriant vidurūšinę genetinę įvairovę. Šie regionai leidžia nustatyti skirtingus haplotipus tarp tos pačios rūšies individų ir įvertinti jų pasiskirstymą populiacijose. Dėl šių savybių mtDNR kontrolinis regionas laikomas vienu svarbiausių genetinių žymenų, naudojamų populiacijų genetinės struktūros analizei bei rūšių ir porūšių identifikavimui (Wan et al., 2004).



1.6 pav. Žmogaus mtDNR kontrolinio regiono struktūra.

<https://www.sas.upenn.edu/~tgschurr/labwork/labwork.html>

1.3.5. Mitochondrinės DNR citochromo b regionas

Mitochondrinės DNR citochromo b (cyt b) genas yra vienas iš baltymus koduojančių mitochondrijų genomo segmentų, atliekantis svarbų vaidmenį elektronų transporto grandinėje ląstelinio kvėpavimo metu (Zhao et al., 2009). Jo ilgis siekia apie 1140 bazių porų (Linacre, 2012), pasižymi santykinio konservatyvumu, kuris siejamas su funkcinė svarba oksidacinio fosforilinimo procese. Tačiau nepaisant šio konservatyvumo, geno sekoje kaupiasi pakankamai daug mutacijų, todėl jis išlieka informatyvus genetiniuose tyrimuose. Dėl šių savybių cyt b genas plačiai naudojamas kaip genetinis žymuo rūšių identifikavimui, filogenetiniams tyrimams bei evoliucinių ryšių analizei (Castresana, 2001).

Cyt b geno sekose dažniausiai aptinkamos sinoniminės mutacijos, kurios nekeičia aminorūgščių sekos, todėl genas išlieka funkcinio požiūriu stabilus, tačiau kartu išlaiko genetinį kintamumą. Be to, šis genas yra plačiai paplitęs tarp skirtingų gyvūnų grupių, todėl leidžia palyginti genetinius duomenis tarp rūšių. Dėl tinkamo konservatyvumo ir kintamumo balanso cyt b genas yra ypač tinkamas tiek artimai susijusių, tiek labiau nutolusių taksonų analizei (Johns & Avise, 1998).

1.3.6. Mitochondrinės DNR ribotumas

Nepaisant plataus mitochondrinės DNR taikymo populiacinėje genetikoje, šis genetinis žymuo turi savų ribotumų. Vienas iš pagrindinių trūkumų – motininis paveldėjimas, dėl kurio mtDNR atspindi tik motininės linijos genetinę istoriją ir neapima tėvinės kilmės informacijos. Dėl to gauti rezultatai nevisada atspindi visą populiacijos genetinę struktūrą (Avise, 2000).

Kitas svarbus aspektas, jog mtDNR sudaro vienas genetinis lokusas, todėl jos pagrindu atlikta analizė ne visada reprezentuoja viso genomo variaciją. Dėl šios priežasties mtDNR duomenys dažnai turi būti derinami su branduolinės DNR žymenimis, siekiant išsamesnio populiacijų genetinės įvairovės vertinimo (Ballard & Whitlock, 2004).

Taip pat mitochondrinė DNR gali būti veikiama selekcijos, ypač dėl jos vaidmens ląstelinio kvėpavimo procesuose. Tokiais atvejais mtDNR variacija gali neatspindėti neutralių evoliucinių procesų, todėl interpretacija turi būti atliekama atsargiai (Galtier et al., 2009).

Paminėtinas ir heteroplazmijos atvejis – reiškinys, kai vienoje ląstelėje egzistuoja daugiau nei vienas mtDNR variantas. Heteroplazmija gali apsunkinti genetinių duomenų analizę ir jų interpretaciją, ypač tiriant mažus genetinius skirtumus tarp individų ar populiacijų (Stewart & Chinnery, 2015).

2. Medžiagos ir metodai

2.1 Medžiagos

2.1.1 Tiriamoji medžiaga

Tyrimas buvo atliekamas su 262 slankų mėginiais (2.1 lentelė). Iš Lietuvos ir Ispanijos medžiotojų buvo gauti mėgintuvėliai su slankų širdies arba kepenų audiniais, fiksuoti etanolyje. Kaip genetiniai žymenys pasirinkti mtDNR kontrolinio regiono hipervariabilioji ir konservatyvi sritys. Tyrime analizuoti slankų, sumedžiotų 2025 m. rugsėjo mėn. Lietuvoje Klaipėdos regione, 6 Ispanijos regionuose ir Baltarusijoje audinių pavyzdžiai. Slankų mėginiai yra saugomi Valstybinio mokslinio tyrimų instituto Gamtos tyrimų centro Molekulinės ekologijos laboratorijoje.

2.1 lentelė. Skirtingose vietovėse sumedžiotų slankų, kurių DNR pavyzdžiai analizuoti šiame darbe, skaičius.

Vietovė	Regionas	Analizuotų mėginių skaičius
Lietuva		53
Ispanija	Ekstremadūra	32
	Maljorka	9
	Katalonija	52
	Navara	30
	Baskija	44
	Aragonas	21
Baltarusija		21

2.1.2 Reagentai

2.2 lentelėje yra pateiktos cheminės medžiagos ir jų rinkiniai, kurie buvo naudoti darbo metu.

2.2 lentelė. Darbe naudotų reagentų pavadinimai, jų aprašymas, gamintojas bei paskirtis.

Pavadinimas	Aprašymas, sudėtis	Gamintojas	Paskirtis
70 % etanolis	Etanolis	AB „Vilniaus degtinė“, Vilnius, Lietuva	DNR išskyrimas
20 % SDS	Natrio dodecilsulfatas		
Izopropanolis	2-hidroksipropanas, izopropilo alkoholis, IPA, dimetilkarbonilis, izopropanolis		
Salt homogenizing buffer	Homogenizuojantis tirpalas: 0,4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA pH 8.0		
6 M NaCl	Natrio chlorido tirpalas		
Elution buffer	Eliucijos buferis	Carl Roth GmbH & Co, Baden-Württemberg, Germany	PGR
Proteinazė K	Fermentas proteinazė K		
Dream Taq PCR Master Mix (2X)	PGR mišinys: 2X Dream Taq buferis, Dream Taq polimerazė, 0,4 mM dATP, 0,4 mM dCTP, 0,4 mM dGTP, 0,4 mM dTTP, 4 mM MgCl ₂		
Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated)	Vanduo, neturintis nukleazių		
1× TAE buferis	Elektroforezės buferis: 40 mM TRIS-acetato, 2 mM EDTA pH 8.0		
Ethidium bromide	Etidžio bromidas	UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“, Vilnius, Lietuva	Elektroforezė
TopVision™ LE GQ	Agarozė		
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	DNR ilgio standartas		
ExoI	Fermentas egz nukleazė, 20 U/μL		Mėginių paruošimas sekoskaitai
FastAP	Fermentas šarminė fosfatazė, 1 U/μL		

PGR naudotos pradmenų poros nurodytos 2.3 lentelėje.

2.3 lentelė. Darbe naudotos dvi pradmenų poros, naudotos *S. rusticola* mtDNR kontrolinio regiono fragmentų amplifikavimui bei sekoskaitai.

Pavadinimas	Pradmenų orientacija	Seka 5' → 3'
Sco1L	Tiesioginis	TGTCAGGGCCATAAACGGAT
Sco1R	Atvirkštinis	GGTTTGATTGTTTCGGCTGGT
ScoUL	Tiesioginis	TAATGTCCTGCGTTACTAGCTTCA
ScoUR	Atvirkštinis	ATCATGTCCCACAAGCATTC

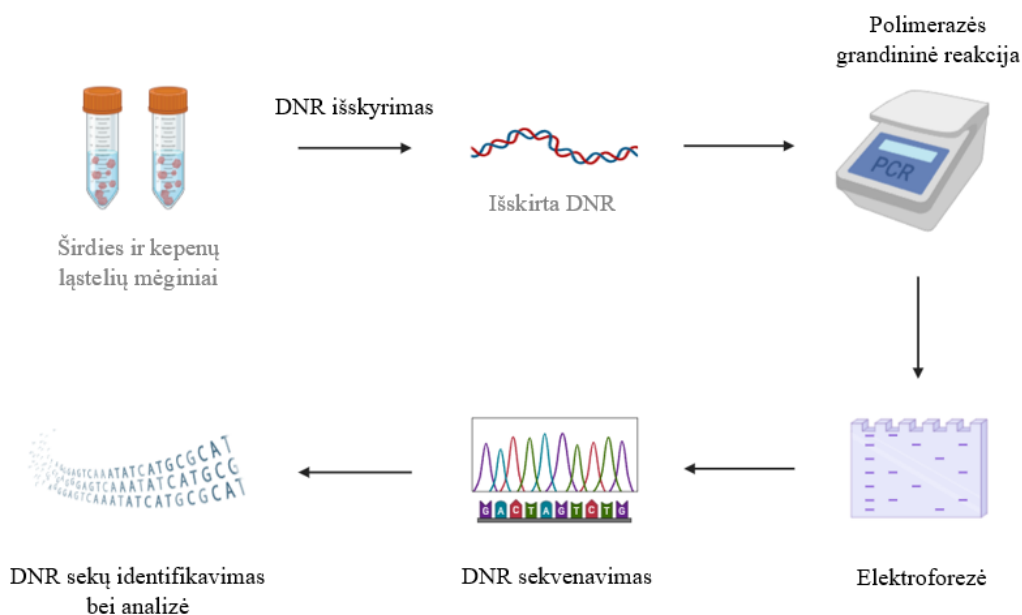
2.1.3 Laboratorinė įranga

Tyrimo metu naudotą įrangą sudarė: termocikleris „GeneAmp PCR System 9700“ (Applied Biosystems), laminarinė traukos spinta, elektrinė plytelė, horizontalaus gelio elektroforezės aparatas „BIOCOMdirect“, centrifuga „Eppendorf Centrifuge 5415 R“, UV transliuminatorius „Biodoc Analyse“ (Biometra), nanofotometras „Implen“, termostatuojama purtyklė „Eppendorf Thermomixer comfort“.

Kiti naudoti prietaisai: automatinės pipetės, mikroskopavimo adatėlės, stikliniai laboratoriniai indai, antgaliai, sterilūs „Eppendorf“ mėgintuvėliai.

2.2 Metodai

Slankų populiacinės genetinės struktūros analizė yra tęstinis mano bakalaurnio darbo tyrimas, atliktas naudojant mtDNR kontrolinį regioną kaip genetinį žymenį. Bakalauro metu sukurti Sco1L/Sco1R pradmenys, kimbantys mtDNR kontroliniame regione, pasirodė esą informatyvesni už mtDNR citochromo b regiono pasirinktus pradmenis. Tai yra pirmą kartą Lietuvoje atliekamas genetinis tyrimas su slankomis, analizuojantis ne tik Lietuvoje, bet ir Ispanijoje bei Baltarusijoje sumedžiotus individus. Pasirinkti metodai yra universalūs ir plačiai naudojami tokio tipo tyrimuose, išskyrus naujai sukurtą Sco1L/Sco1R pradmenų porą. Supaprastinta metodologijos schema pavaizduota 2.1 paveiksle.



2.1 pav. Pateikta apibendrinta tyrimo metodika. Sukurta su *BioRender.com*.

2.2.1 DNR išskyrimas

DNR išskyrimas buvo vykdomas pagal Aljanabi ir Martinez protokolą (Aljanabi & Martinez, 1997). Gautuose mėgintuvėliuose buvo arba širdies, arba kepenų audiniai, priklausomai nuo to, ką medžiotojai įdėjo. Atpjautos mažos audinių dalys buvo įdedamos į atskirus 1,5 mL „Eppendorf“ mėgintuvėlius, kuriuose prieš tai įpilama 300 µL homogenizuojančio buferio. Įdedama 30 µL 20 % SDS ir 8 µL 20 mg/mL proteinazės K, švelniai sumaišius mėgintuvėliai įstatomi į 55 °C termostatuojamą purtyklę 2 valandom. Ištirpus audiniams įpilama 300 µL 6 M NaCl, švelniai sumaišoma ir centrifuguojama (15 min, 10000 x g). Supernatantas perpilamas į naujus 1,5 mL „Eppendorf“ mėgintuvėlius, pripylus 500 µL izopropanolio ir švelniai sumaišius mėginiai įdėti 24 valandoms į šaldiklį. Praėjus nustatytam laikui vykdomas centrifugavimas (10 min, 15000 x g). Pašalinamas supernatantas, ant nuosėdų užpilama 300 µL 70 % etanolio ir vykdomas centrifugavimas (5 min, 15000 x g). Supernatantas nupilamas ir mėgintuvėliai apverčiami ir padedami ant filtrinio popieriaus 2 min. Galiausiai įpilama 50 µL eliucijos buferio ir švelniai sumaišoma. Mėginiai po DNR skyrimo laikomi -20 °C šaldiklyje.

2.2.2 Polimerazės grandininė reakcija

DNR amplifikacija buvo vykdoma pagal Thermo Fisher Scientific Baltics gamintojo rekomendacijas, pateiktas „GeneJET Genomic DNA Extraction Kit“. DNR pagausinimui buvo naudotos 2 pradmenų poros, skirtos amplifikuoti skirtingus mtDNR kontrolinio regiono fragmentus. PGR sąlygos, atliekant reakcijas su abiejomis pradmenų poromis, buvo tokios pačios. 2.4 lentelėje pateiktos reakcijos sąlygos.

2.4 lentelė. PGR sąlygos.

94 °C	5 min	
94 °C	35 s	35 ciklai
55 °C	45 s	
72 °C	55 s	
72 °C	5 min	

PGR mišinio, skirto pagausinti vieno mėginio DNR fragmentą tūris siekė 25 µL. Bendrą PGR mišinio tūrį sudaro 12,5 µL DreamTaq polimerazės buferinio tirpalo, 0,5 µL tiesioginio bei 0,5 µL atvirkštinio pradmens, 9,5 µL vandens be nukleazų ir 2 µL DNR. Norint užtikrinti naudojamų

reagentų grynumą bei švarumą yra paruošiama neigiama kontrolė, vietoj DNR įpilamas toks pat kiekis vandens. Po amplifikacijos mėginiai laikomi -20 °C šaldiklyje. PGR atliekamas „GeneAmp PCR System 9700“ (Applied Biosystems) termocikleryje.

2.2.3 Elektroforezė

Elektroforezės metu yra tikrinama DNR amplifikacija po PGR. Paruošiamas 1,5 % agarozės gelis: 40 mL TAE buferiniame tirpale ištirpinama 600 mg agarozės miltelių visą mišinį kaitinant ir maišant tol, kol tirpalas tampa skaidrus. Tirpalas paliekamas atvėsimui iki 55 °C, vėliau įlašinama 1 µL 0,5 µg/mL etidžio bromido ir įpylus į specialią vonelę paliekama sustingti apie 20 min. Į paruošto gelio šulinėlius įleidžiami tiriamieji mėginiai palikus pirmuosius eilių šulinėlius tuščius molekuliniam dydžio standartui (2 µL). Elektroforezė vykdoma 30 min. esant 90 V įtampai. Elektroforezės gelis analizuojamas „Biodoc Analyse“ (Biometra) transliuminatoriumi.

2.2.4 Sekoskaita ir duomenų apdorojimas

Amplifikuoti mėginiai ruošiami sekoskaitai juos išvalant su egzonukleaze ExoI ir šarmine fosfataze FastAP pagal fermentų rinkinio gamintojo rekomendacijas. Pagausintų mėginių sekoskaitą atliko Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Gamtos tyrimų centro Molekulinės ekologijos laboratorijos vyr. laborantė Evelina Maziliauskaitė 3500 Genetic Analyser prietaiso pagalba. Naudojant programą Chromas gautos DNR sekos buvo tvarkomos rankiniu būdu. DNR sekos buvo sulygintos taip, kad visos prasidėtų ir baigtųsi tokiais pačiais nukleotidų fragmentais. Apdorotos DNR sekos buvo įkeltos į MEGA 11.0.11 programą bei sulygintos panaudojus ClustelW algoritmą. Apdorojus duomenis MEGA programoje sukurti filogenetiniai medžiai, kurių konstravimui naudotas NJ (angl. *Neighbor-Joining*) algoritmas. Vienas iš filogenetinių medžių buvo papildomai apdorotas iTOL internetinėje svetainėje siekiant optimizuoti rezultato vizualizavimą bei interpretavimą. Filogenetiniai medžiai sukonstruoti remiantis MEGA ir iTOL internetinėse svetainėse esančiomis naudojimo instrukcijomis. Analizuotos DNR sekos buvo lyginamos su NCBI Genų banke esančiomis slankiai artimų rūšių sekomis naudojant NCBI BLAST internetinį įrankį (Altschul et al., 1990).

Pasinaudojus internetiniu DNR sekų įrankiu FaBox 1.61 ir MEGA programa buvo sugeneruotos lentelės, parodančios haplotipų pasiskirstymą haplogrupėse tiriamuosiuose mėginiuose. Su Network 10.2 programa buvo sugeneruoti haplotipų tinklai pagal haplotipų lentelėse esančias DNR sekas. Haplotipų tinklai bei lentelės sugeneruotos remiantis programų kūrėjų naudojimo instrukcijomis, prieinančiomis internete.

3. Rezultatai

Šiame skyriuje pateikiami atliktos slankų populiacinės genetinės struktūros analizės rezultatai, gauti panaudojant mtDNR genetinius žymenis. Tyrime buvo iš viso analizuoti 262 slankų individai, surinkti iš trijų Europos regionų: Lietuvos, Ispanijos ir Baltarusijos. Pirmiausia aprašomi DNR koncentracijos ir amplifikacijos kokybės įvertinimas, toliau pateikiami sekų analizės rezultatai, įskaitant sekų suliginimą, filogenetinių medžių kūrimą, haplotipų identifikavimą bei jų pasiskirstymą tirtose imtyse. Galiausiai pristatomi haplotipų tarpusavio ryšiai, atvaizduoti haplotipų tinklų pagalba. Rezultatai šiame skyriuje pateikiami aprašomuoju būdu, jų interpretacija ir aptarimas pateikiami kitame darbo skyriuje.

3.1 DNR koncentracijos nustatymas

Atlikus DNR išskyrimą Aljanabi ir Martinez metodu (Aljanabi & Martinez, 1997) kiekvieno mėginio DNR koncentracija nustatyta nanofotometru. Mėginiai, kuriuose DNR koncentracija buvo didesnė nei 200 µg/mL, buvo atskiesti dH₂O iki nustatytos tinkamiausios DNR koncentracijos – 20 µg/mL (Kirby, 1990). Iš viso buvo atskiesti 49 mėginiai. Mėginiai skiesti santykiu 1:6 (3.1 lentelė).

3.1 lentelė. Skiestų mėginių apytikslė DNR koncentracija bei panaudotas vandens kiekis skiedimui.

Apytikslė DNR konc. (µg/mL)	Skiedimas (µL)
200–285 µg/mL	20 µL DNR, 20 µL dH ₂ O
295–390 µg/mL	20 µL DNR, 40 µL dH ₂ O
410–495 µg/mL	20 µL DNR, 60 µL dH ₂ O
500–580 µg/mL	20 µL DNR, 80 µL dH ₂ O
600–670 µg/mL	20 µL DNR, 100 µL dH ₂ O
720 µg/mL	20 µL DNR, 120 µL dH ₂ O

3.2 DNR amplifikacijos rezultatai

Tyrimas buvo atliktas su dvejomis pradmenų poromis, priklausančioms mtDNR kontroliniam regionui: Sco1L/Sco1R ir ScoUL/ScoUR. Pradmenų kibimo vietos mtDNR kontroliniame regione pavaizduotos 3.1 paveiksle.



3.1 pav. *Scolopax rusticola* mtDNA kontrolinio regiono seka. Pažymėtos apytikslės hipervariabiliosios (HVRI ir HVRII) ir konservatyvi (CR) vietos, geltona spalva žymi ScoUL/ScoUR pradmenų kibimo vietas, žalia spalva – Sco1L/Sco1R pradmenų kibimo vietas.

Kadangi bakalauro metu buvo išsiaiškinta, kad informatyviausias yra mtDNR žymuo pagausinamas naudojant pradmenų porą Sco1L/Sco1R, kurios pagalba amplifikuotas kontrolinio regiono fragmentas apimantis dalį konservatyvios sekos CR regione bei kitą dalį hipervariabilios sekos HVRI regione (3.1 pav.) magistrinio darbo metu buvo siekiama visą tyrimą atlikti naudojant tik šią pradmenų porą. Po DNR amplifikacijos iš 262 DNR mėginių pavyko pagausinti 220 mėginių fragmentus (3.2 lentelė).

3.2 lentelė. Nurodytas su Sco1L/Sco1R pradmenų pora amplifikuotų mėginių skaičius bei vietovės, iš kurių buvo gauti tiriamieji mėginiai.

Mėginių skaičius	Vietovė
47	Lietuva
160	Ispanija
13	Baltarusija

Su 42 mėginiais, kuriuose DNR nepasigausino su Sco1L/Sco1R pradmenimis, buvo atlikta DNR amplifikacija su ScoUL/ScoUR pradmenų pora (3.3 lentelė). Kadangi ši pradmenų pora apima konservatyviają kontrolinio regiono sritį, ji yra gana universali, nors apima santykinai trumpą DNR fragmentą – iki 400 bazių porų ilgio. Su šia pradmenų pora pavyko pagausinti dalį mėginių, kurių amplifikacija naudojant Sco1L/Sco1R pradmenimis nepavyko. Tokiu būdu patvirtinta, kad visi tyrime naudoti audinių pavyzdžiai priklauso *Scolopax rusticola* rūšiai, o nesėkminga dalies mėginių DNR fragmentų amplifikacija, greičiausiai, sietina su taškinėmis mutacijomis, kurios pasitaikė pradmenų prikibimo zonoje.

3.3 lentelė. Nurodytas su ScoUL/ScoUR pradmenų pora amplifikuotų mėginių skaičius bei vietovės, iš kurių buvo gauti tiriamieji mėginiai.

Mėginių skaičius	Vietovė
6	Lietuva
28	Ispanija
8	Baltarusija

3.3 Sekų sulyginimas bei filogenetinė analizė

Po sekoskaitos gauti rezultatai pirmiausia buvo tikrinami Chromas programa: buvo įvertintas gautų sekų švarumas ir DNR sekos taip sulygintos, kad prasidėtų ir baigtųsi ties ta pačia nukleotido pozicija. Analizuotų sekų ilgiai pateikti 3.4 lentelėje.

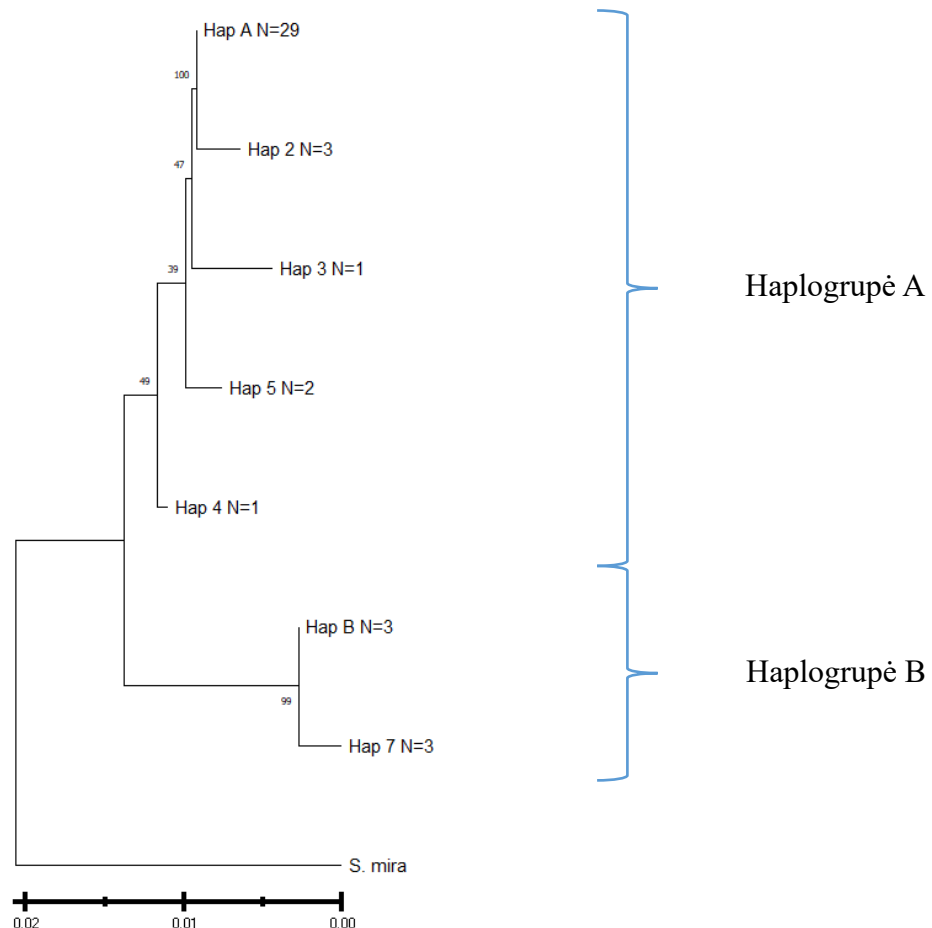
3.4 lentelė. Analizuoti slankų mtDNR fragmentų, pagausintų su kiekviena pradmenų pora, sekų ilgiai.

Pradmenų pora	Sekos ilgis
Sco1L/Sco1R	663 bp
ScoUL/ScoUR	364 bp

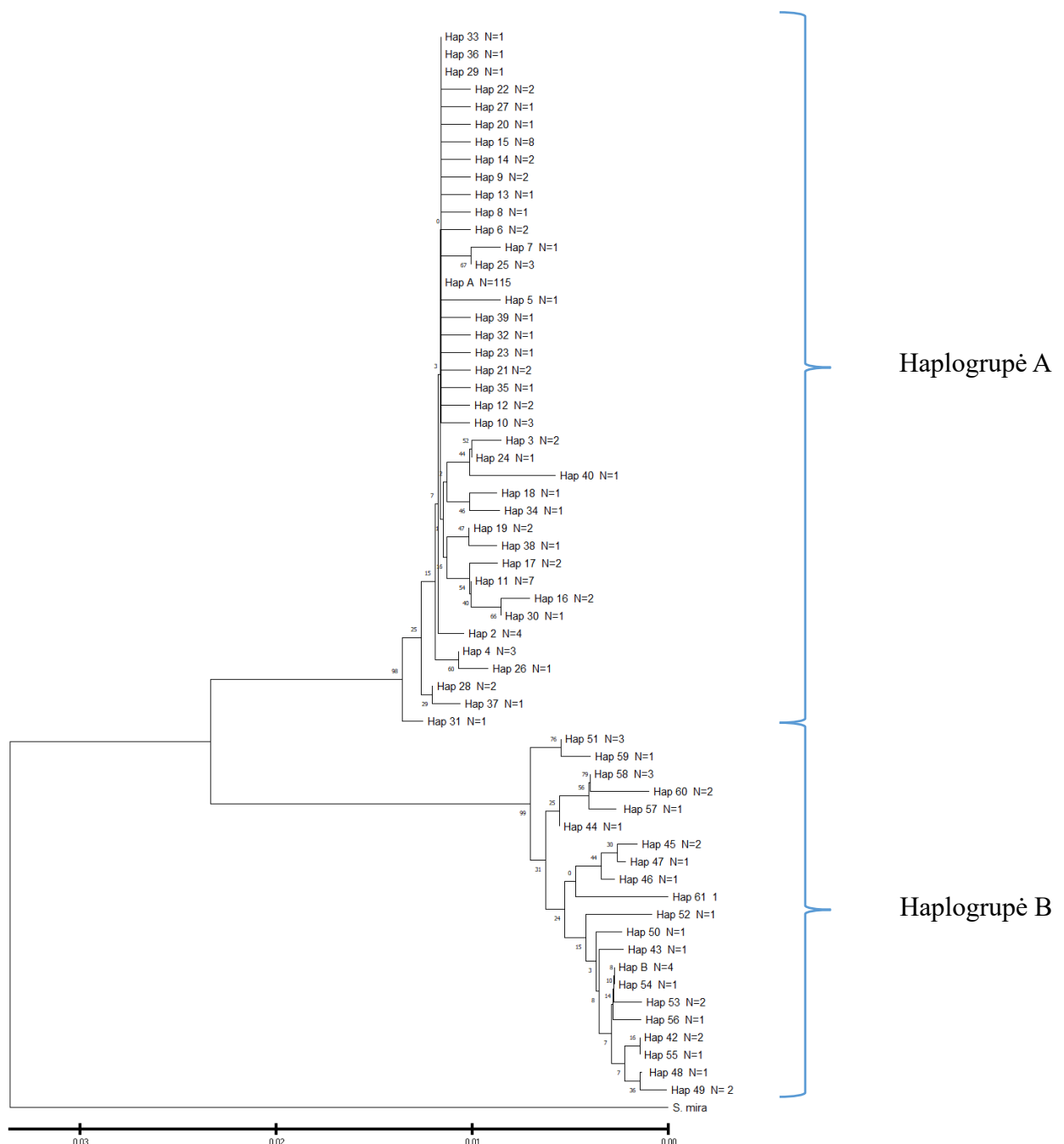
Peržiūrėjus ir suvienodinus DNR sekų ilgį, jos buvo rankiniu būdu įkeltos į MEGA programą ir panaudojus ClustalW algoritmą buvo sulygintos tarpusavyje. Remiantis šiomis DNR sekomis buvo sukurti du filogenetiniai medžiai: vienas su Sco1L/Sco1R, kitas – ScoUL/ScoUR pradmenimis. Medžiams sukurti buvo naudojamas NJ (angl. *Neighbor-Joining*) algoritmas, taip pat buvo remtasi MEGA internetiniame puslapyje pateiktomis programos naudojimo instrukcijomis. Dėl didelio

analizuotų sekų skaičiaus sudarytas filogenetinis medis su Sco1L/Sco1R pradmenų pora MEGA programoje buvo sudėtingai interpretuojamas, todėl siekiant aiškesnio vizualinio pateikimo jis buvo eksportuotas ir papildomai apdorotas naudojant iTOL (angl. *Interactive Tree of Life*) platformą. Sukonstruotame filogenetiniame medyje (žr. 1 priedą) galima matyti, kad slankų mėginiai, priklausantys atskiroms haplogrupėms, priskirtini individams, sumedžiotiems visose tirtose vietovėse. Medyje, sukonstruotame naudojant sekas pagausintas su ScoUL/ScoUR pradmenimis dėl mažesnio sekų variabilumo individų išsiskirstymas į haplogrupes pagal vietas labiau išreikštas (žr. 2 priedą).

Siekiant palyginti gautų sekų panašumą su kitomis *Scolopax* genčiai priklausančiomis rūšimis naudojant BLAST sistemą nustatyta, kad artimiausia rūšis *Scolopax mira*, kurios homologinės sekos panaudotos sugeneruojant ScoUL/ScoUR ir Sco1L/Sco1R haplotipų filogenetinius medžius kaip išorinės kontrolinės grupės atstovo mėginys (atitinkamai 3.2 pav. ir 3.3 pav.).



3.2 pav. Filogenetinis medis, vaizduojantis skirtingų haplotipų panašumą tarpusavyje bei su *S. mira* rūšimi (ScoUL/ScoUR pradmenų pora). Prie kiekvieno haplotipo nurodytas tiriamųjų individų skaičius, turintis tokią pačią DNR seką. Mėlyni skliaustai nurodo, kurie haplotipai priskirtini kurioms haplogrupėms.



3.3 pav. Filogenetinis medis, vaizduojantis skirtingų haplotipų panašumą tarpusavyje bei su *S. mira* rūšimi (Sco1L/Sco1R pradmenų pora). Prie kiekvieno haplotipo nurodytas tiriamųjų individų skaičius, turintis tokią pačią DNR seką. Mėlyni skliaustai nurodo, kurie haplotipai priskirtini kurioms haplogrupėms.

3.4 Polimorfinių vietų analizė

Siekiant nustatyti polimorfines vietas analizuojamojoje DNR dalyje, MEGA programos pagalba buvo sukurtos haplotipų lentelės. Su Sco1L/Sco1R pradmenimis pagausintais mėginiais iš viso buvo identifikuoti 61 haplotipai, iš kurių 40 priklauso haplogrupei A, o likę 21 – haplogrupei B

(žr. 3 priedą). Lentelėje pateiktos tik polimorfinės nukleotidų pozicijos. Taškai žymi sutapimą su referentiniu haplotipu, o raidės nurodo aptiktus vieno nukleotido pokyčius. Analizė parodė nevienodą haplotipų pasiskirstymą tarp haplogrupių – haplogrupei A nustatyta daugiau skirtingų haplotipų bei didesnis jų dažnis, tuo tarpu dalis haplotipų, priklausančių haplogrupei B, buvo reti ir aptikti tik pavieniuose mėginiuose.

Išanalizavus haplotipų lentelę buvo išskirta 16 pozicijų DNR sekoje, kuriose buvo aptiktos tos pačios nukleotidų pakaitos visuose haplogrupei B priskirtinuose individuose (3.5 lentelė).

3.5 lentelė. Nurodytos pakitusios nukleotidų pozicijos analizuotoje DNR sekoje. Ref. seka – referentinė seka, pagal kurią buvo analizuota visa lentelė. Hap_B – visi individai, kuriuose buvo rastos tos pačios nukleotidų pakaitos.

Haplogrupė	Nukleotido pozicija DNR sekoje															
	156	245	254	278	416	449	458	483	498	507	560	578	584	600	633	635
Ref. seka	T	C	T	A	G	G	C	T	A	A	A	C	T	A	T	A
Hap_B	C	T	C	G	A	A	T	C	G	G	G	T	C	G	C	G

Taip pat haplogrupėje B buvo rasta 13 papildomų nukleotidų insercijų, kurių nėra referentinėje sekoje (3.6 lentelė). Įdomu tai, kad 9 iš 13 nukleotidų eina vienas po kito, taip sudarydami papildomos sekos įsiterpimo įspūdį.

3.6 lentelė. Nurodytos nukleotidų insercijos, aptiktos haplogrupėje B. Ref. seka – referentinė seka, pagal kurią buvo analizuota visa lentelė. Hap_B – visi individai, kuriuose buvo rastos tos pačios nukleotidų insercijos.

Haplogrupė	Nukleotido pozicija DNR sekoje												
	453	524	525	526	527	528	529	530	531	532	536	540	570
Ref. seka	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap_B	T	A	C	C	C	A	A	C	A	T	A	C	A

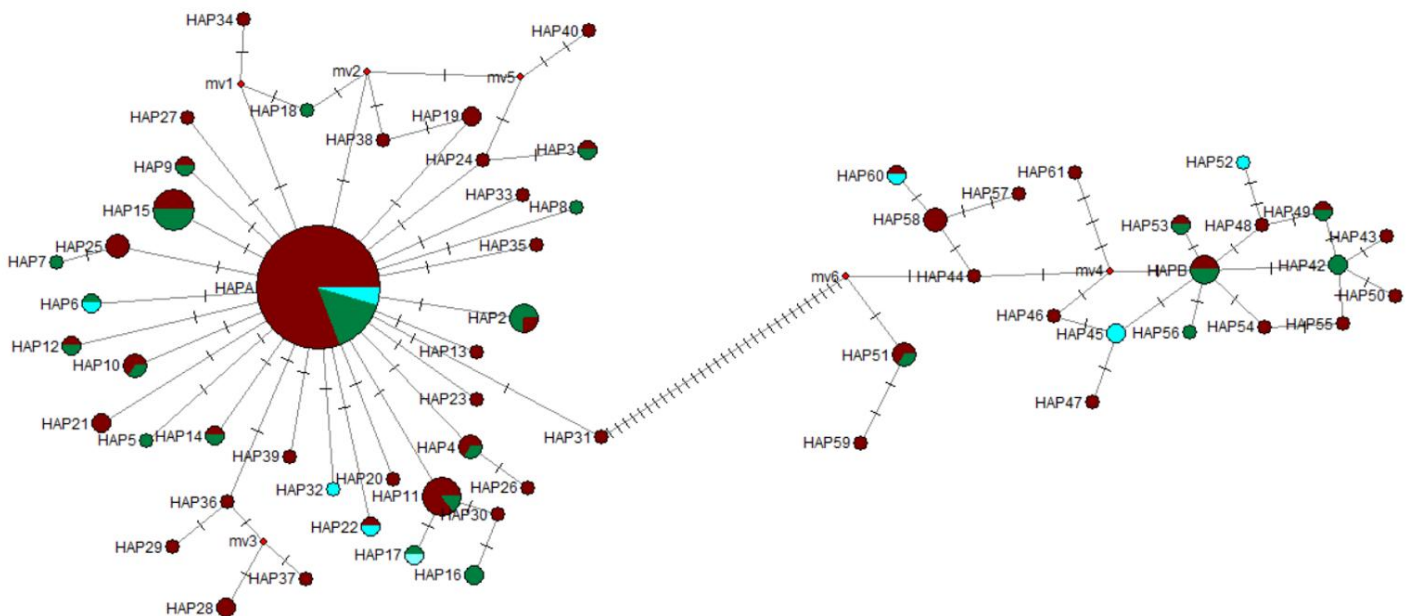
Su ScoUL/ScoUR pradmenimis pagausintais mėginiais iš viso buvo identifikuoti 7 haplotipai, iš kurių 5 priklauso haplogrupei A, o tuo tarpu 2 – haplogrupei B (3.4 pav.). Nors tiek analizuotos sekos ilgis, tiek mėginių skaičius yra ženkliai mažesnis, lyginant su Sco1L/Sco1R pradmenimis, vistiek buvo aptiktas individų išsiskirstymas į tas pačias haplogrupes.

Hap_Nr	N	22	32	86	174	209	218	224	313	322	346	Region
Hap_A	29	A	A	A	T	T	T	T	C	T	A	ES/LT/BLR
Hap_2	3	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	ES/LT
Hap_3	1	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	ES
Hap_4	1	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	BLR
Hap_5	2	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	BLR
Hap_B	3	G	.	.	C	.	.	C	T	C	G	ES
Hap_7	3	G	.	.	C	.	C	C	T	C	G	ES

3.4 pav. Haplotipų lentelė (ScoUL/ScoUR pradmenų pora). Hap_A ir Hap_B nurodo haplogrupes, Hap_Nr – haplotipų skaičių. N nurodo individų skaičių, priskirtinų haplotipams. Virš referentinės (pirmosios) sekos esantis skaičius nurodo nukleotido poziciją sekoje, kurioje yra įvykusi mutacija. Vietovės parašytos sutrumpintai: LT – Lietuva, ES – Ispanija, BLR – Baltarusija.

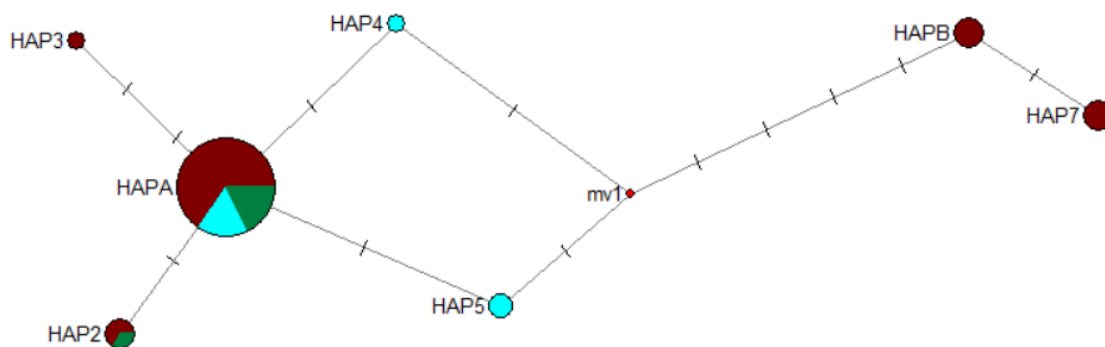
3.5 Haplotipų tinklo sudarymas

Siekiant vizualiai interpretuoti tiriamųjų individų tarpusavio genetinius ryšius buvo sukonstruoti haplotipų tinklai (angl., *Median-Joining network*). 3.5 pav. yra vizualiai pavaizduota, kaip haplotipai pasiskirstė haplogrupėse tarp slankų individų, tirtų su Sco1L/Sco1R pradmenimis. Nubraižytas haplotipų tinklas atspindi haplotipų lentelėje (žr. 3 priedą) pateiktus rezultatus. Abi haplogrupes skiria 32 mutaciniai žingsniai.



3.5 pav. Haplotipų tinklas (Sco1L/Sco1R). Apskritimai žymi haplotipus, prie kiekvieno iš jų nurodytas haplotipo numeris. Apskritimo dydis nurodo individų dažnį. Brūkšneliai tarp apskritimų nurodo kiek nukleotidų pakaitų skiria haplotipus. Spalvos nurodo vietas, iš kurių buvo surinkti individai: tamsiai raudona – Ispanija, žalia – Lietuva, mėlyna – Baltarusija. Šviesiai raudona spalva žymi galimą mutacinį tašką.

Haplotipų tinklas, sukurtas su ScoUL/ScoUR pradmenimis pagausintais mėginiais, patvirtina haplotipų lentelėje (3.4 pav.) individų išsiskirstymą į atskiras haplogrupes (3.6 pav.). Abi haplogrupes skiria 4 mutaciniai žingsniai.



3.6 pav. Haplotipų tinklas (ScoUL/ScoUR). Apskritimai žymi haplotipus, prie kiekvieno iš jų nurodytas haplotipo numeris. Apskritimo dydis nurodo individų dažnį. Brūkšneliai tarp apskritimų nurodo kiek nukleotidų pakaitų skiria haplotipus. Spalvos nurodo vietas, iš kurių buvo surinkti individai: tamsiai raudona – Ispanija, žalia – Lietuva, mėlyna – Baltarusija. Šviesiai raudona spalva žymi galimą mutacinį tašką.

Nubraižyti haplotipų tinklai ne tik patvirtina haplotipų lentelėse pateiktą informaciją apie haplotipų pasiskirstymą haplogrupėse, bet taip pat ir patvirtina MEGA programos sekų suliginimuose bei filogenetiniuose medžiuose gautus rezultatus apie haplogrupėms priskirtinus individus. 3.7 lentelėje pateikta konkretizuota informacija, apie visų tirtų individų priskirtinumą vienai iš dviejų haplogrupių atlikus analizę tiek su Sco1L/Sco1R, tiek su ScoUL/ScoUR pradmenimis.

3.7 lentelė. Nurodytas slankų, sumedžiotų skirtingose vietovėse, skaičius priklausantis vienai iš dviejų haplogrupių.

Vietovė	Hap_A	Hap_B
Lietuva	45	8
Ispanija	161	27
Baltarusija	18	4

4. Rezultatų aptarimas

Atlikus slankų mtDNR kontrolinio regiono analizę buvo aiškiai matomas tiriamų individų išsiskirstymas į dvi haplogrupes. Haplogrupių buvimą patvirtino visos naudotos analizės: filogenetiniai medžiai, haplotipų lentelės bei tinklai. Tyrime pasirinktos dvi kontrolinio regiono sritys, hipervariabilioji ir konservatyvi, nepaisant skirtingo analizuoto individų skaičiaus, patvirtino mėginių išsiskirstymą į haplogrupes.

Nepaisant kuriame iš trijų regionų buvo sumedžiotos slankos, šios rūšies individai buvo rasti abiejose haplogrupėse. Tokį rezultatą gali paaiškinti intensyvi rūšies migracija ir didelis genų srautas tarp skirtingų regionų populiacijų. Panašios tendencijos buvo nustatytos ir kituose tolimųjų migracijų paukščių rūšyse (Lombardo et al., 2022).

Mūsų atliktame tyrime identifikuota haplogrupė B pasižymėjo ryškiu genetiniu išskirtinumu. Šiai haplogrupei priklausančių individų mtDNR sekose buvo aptikta 16 pastovių nukleotidų pakaitų, kurių nebuvo referentinėje sekoje. Reikia paminėti, kad tarp įsiterpusių nukleotidų 9 sudarė trumpą ištisinę seką. Tokie pasikartojantys skirtumai rodo ilgesnį evoliucinį atsiskyrimą tarp genetinių linijų. Analizė taip pat parodė, kad haplogrupė A pasižymėjo didesne genetinė įvairove nei haplogrupė B: haplogrupei A buvo priskirta daugiau skirtingų haplotipų bei aptiktas didesnis jų dažnis. Didesnė genetinė įvairovė dažnai siejama su didesniu efektyviu populiacijos dydžiu, senesne kilme arba intensyvesniu genetiniu maišymusi tarp individų. Tuo tarpu mažesnė genetinė įvairovė gali rodyti mažesnę populiacijos dydį ar genetinį „butelio kaklelio“ efektą (Hartl & Clark, 2007).

Slankų vidurūšinę genetinę įvairovę pirmą kartą analizavo 2011 metais italų mokslininkų komanda (Trucchi et al., 2011). Jie savo tyrime pasirinko mtDNR citochromo b regioną ir branduolio DNR β -fibrinogeną koduojančią seką kaip genetinius žymenis. Analizė su branduolio genu neparodė jokios genetinės diferenciacijos tiriamoje rūšyje, tačiau su mtDNR citochromo b žymeniu buvo nustatytas dviejų haplogrupių buvimas rūšyje. Jų tyrime buvo aptikti 37 haplotipai, priklausantys haplogrupei A, ir 13 haplotipų, priklausančių haplogrupei B. Nubraižytas haplotipų tinklas parodė 12 mutacinių žingsnių tarp abiejų haplogrupių. Tiek mūsų darbe, tiek italų mokslininkų, analizuota slankų imtis buvo panaši – virš 200 individų. Tačiau mūsų darbe tiek aptiktų haplotipų skaičius pasirodė esąs didesnis abiejose haplogrupėse, tiek aptikome daugiau mutacinių žingsnių tarp haplogrupių. Taip pat pagal straipsnyje pateiktus rezultatus citochromo b regionas neparodė insercijų buvimo. Lyginant mūsų darbe gautus rezultatus su mtDNR kontroliniu regionu ir italų tyrime naudotu

mtDNR citochromo b regionu galima daryti išvadą, kad mtDNR kontrolinis regionas yra informatyvesnis tokio tipo tyrimuose.

Tiek mūsų, tiek italų mokslininkų atliktame tyrime analizuotų slankų, surinktų iš skirtingų Europos regionų, pasiskirstymas į dvi haplogrupes, manoma, nutiko dėl ilgalaikės reprodukcinės izoliacijos ledynmečio periodu, kurio metu atskiros slankų populiacijos galėjo vystytis izoliuotai skirtinguose geografiniuose regionuose. Ledynams atsitraukus Europoje atsikūrė miško biotopai, taip atsirandant sąlygoms paukščių migracijai ir populiacijų maišymuisi tarpusavyje. Tai galėjo daryti įtaką panmiktinės slankų populiacijos atsiradimui, ką taip pat patvirtina atlikti vidurūšinės genetinės įvairovės tyrimai tiek su mtDNR kontroliniu regionu, tiek su mtDNR citochromo b regionu.

Išvados

- Atlikta slankų mtDNR kontrolinio regiono sekų analizė patvirtino dviejų haplogrupių egzistavimą tirtose imtyse. Haplogrupėms priklausančių individų dažnis bei paplitimas gali būti svarbus rodiklis ateities tyrimuose analizuojant kituose Europos regionuose sumedžiotų slankų imtimis.
- Lietuvoje, Ispanijoje ir Baltarusijoje medžiojamų slankų populacijose haplogrupės A atstovų paplitimas siekia apytiksliai nuo 82% iki 86%. Manome, kad intensyvi rūšies migracija ir didelis genų srautas tarp skirtingų regionų populiacijų poledynmečio laikotarpiu lėmė panmiktinį slankų populiacijos modelio susiformavimą.
- Šio tyrimo, paremto mtDNR kontrolinio regiono sekoskaita, rezultatai patvirtina italų mokslininkų vykdyto slankų genetinės įvairovės tyrimo išvadas, paremtas citochromo b fragmento analize, tačiau mtDNR kontrolinio regiono fragmentas pasižymėjo didesniu informatyvumu.

Asmeninis indėlis

Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Gamtos tyrimų centro Molekulinės ekologijos laboratorijoje turėjau galimybę atlikti visiškai naują tyrimą, pirmą kartą vykdomą ne tik šiame institute, bet ir visoje Lietuvoje. Tyrimo metu atlikau pagrindinius laboratorinius darbus: DNR išskyrimą, PGR reakcijas naudojant skirtingus pradmenis, DNR amplifikacijos vertinimą elektroforezės metodu bei mėginių paruošimą sekoskaitai. Be laboratorinių darbų taip pat analizavau po sekoskaitos gautas DNR sekas: Chromas programa peržiūrėjau sekų duomenis, MEGA programa atlikau sekų suliginimą ir haplotipų lentelių sudarymą, o naudodama Network programą nubraižiau haplotipų tinklus.

Publikacijų sąrašas ir mokslinės konferencijos

Dalyvavimas mokslinėse konferencijose:

Eva Rūkštelytė, Dalius Butkauskas, Saulius Švažas. „The Intraspecific Genetic Diversity of Eurasian Woodcock (*Scolopax rusticola*) Using Mitochondrial DNA Control Region Sequences“. 84th International Scientific Conference of the University of Latvia. 2026 m. April 15th, University of Latvia, Riga, Latvia.

Publikacijos:

2026 metais gegužės 7d. internetinėje mokslininkų svetainėje „Mokslo Lietuva“ buvo publikuotas **Evos Rūkštelytės** straipsnis „Paslaptingas Lietuvos miškų paukštis: ką apie slankas atskleidžia genetiniai tyrimai“. Nuoroda: https://mokslolietuva.lt/2026/05/paslaptingas-liuvos-misku-paukstis-ka-apie-slankas-atskleidzia-genetiniai-tyrimai/?fbclid=IwY2xjawR2a9pleHRuA2FlbQIxMABicmlkETFzQVhWcHZQUVNJR05qSjkxc3J0YwZhchBfaWQQMjIyMDM5MTc4ODIwMDg5MgABHpHI5j9My7Prvw0dzwrJz4cAztvM7W4c0syy2fS6h8V72DXfqtP2L5gd5-_aem_G84HfpH1Q0fJtlUz8tU0g

Padėka

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovui dr. (HP) Daliui Butkauskui už suteiktą galimybę atlikti praktiką Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Gamtos tyrimų centro Molekulinės ekologijos laboratorijoje. Esu labai dėkinga už nuolatinę pagalbą ir palaikymą darbo metu, perduotas žinias, prisidėjimą prie mano praktinių įgūdžių ugdymo bei parodytą pasitikėjimą leidžiant vykdyti naują tyrimą. Taip pat nuoširdžią padėką skiriu visai laboratorijos komandai už pagalbą atliekant laboratorinius darbus, pasidalintas vertingas praktines žinias bei patarimus, susijusius su baigiamojo darbo rengimu, ir suteiktą draugišką atmosferą.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Eva Rūkštelytė

Magistro baigiamasis darbas

**Slankų (*Scolopax rusticola*) populiacinės genetinės struktūros analizė naudojant
mitochondrinės DNR genetinius žymenis**

SANTRAUKA

Genetinė įvairovė, užkoduota molekuliniame lygmenyje, yra svarbus informacijos šaltinis, leidžiantis tirti vidurūšinius pokyčius, nustatyti populiacijų genetinę struktūrą, giminingumo ryšius bei požymių paveldimumą. Šiame darbe buvo analizuoti slankų (*Scolopax rusticola*) mėginiai, surinkti trijose Europos šalyse – Ispanijoje, Lietuvoje ir Baltarusijoje. Tyrimo metu buvo siekiama nustatyti tiriamų populiacijų genetinę struktūrą, lyginant skirtingas imtis, reprezentuojančias perinčius, migruojančius ir žiemojančius individus skirtinguose Europos regionuose. Tyrimui pasirinktas mitochondrinės DNR kontrolinis regionas, pasižymintis santykinai dideliu kintamumu, lyginant su kitais genetiniais žymenimis. Slankų DNR buvo išskirta iš slankų širdies ir kepenų audinių, o tiksliniai fragmentai buvo amplifikuoti taikant polimerazės grandininę reakciją. Amplifikacijos produktų dydis buvo patikrintas agarozės gelio elektroforezės metodu, o vėliau atlikta mėginių su pagausinta DNR sekoskaita, naudojant tuos pačius pradmenis ir genetinį analizatorių „3500 Genetic Analyser“. Gautos sekos buvo sulygintos ir analizuotos naudojant programą MEGA. Ištyrus skirtingų haplotipų pasiskirstymo pobūdį tiriamose slankų imtyse nustatyta, kad tiriamieji individai gali būti suskirstyti į dvi filogenetiškai diferencijuotas haplogrupes. Haplotipų tinklą, sukonstruotą naudojant programą Network palyginimas patvirtino dviejų haplogrupių egzistavimą slankų populiacijoje bei šių haplogrupių atstovų gana tolygų pasiskirstymą tam tikru dažnumu visame rūšies areale, tikėtina, dėl anksčiau izoliuotų populiacijų maišymosi poledynmečio laikotarpiu.

Eva Rūkštelytė

Master's thesis

Analysis of Population Genetic Structure of Eurasian Woodcock (*Scolopax rusticola*) Using Mitochondrial DNA Genetic Markers

ABSTRACT

Genetic diversity encoded at the molecular level is an important source of information, enabling the study of intraspecific variation, population genetic structure, relatedness, and the inheritance of traits. In this study, samples of Eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*) collected from three European countries – Spain, Lithuania, and Belarus – were analyzed. The aim of the study was to determine the genetic structure of the investigated populations by comparing different sample groups representing breeding, migrating, and wintering individuals from various regions of Europe. The mitochondrial DNA control region, characterized by relatively high variability compared to other genetic markers, was selected for analysis. DNA of Eurasian woodcock was extracted from heart and liver tissues, and targeted fragments were amplified using polymerase chain reaction. The size of the amplification products was verified by agarose gel electrophoresis, followed by DNA sequencing using the same primers and a “3500 Genetic Analyser”. The obtained sequences were aligned and analyzed using the MEGA software. After examining the distribution of different haplotypes in the woodcock samples, it was found that the studied individuals could be divided into two phylogenetically differentiated haplogroups. Comparison of haplotype networks constructed using the Network program confirmed the existence of two haplogroups in the Eurasian woodcock population and the relatively even distribution of representatives of these haplogroups at a certain frequency throughout the species' range, likely due to the mixing of previously isolated populations during the interglacial period.

Literatūros sąrašas

- Ayala, F.J. (2026, March 10). evolution. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/evolution-scientific-theory>
- Aljanabi SM, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 1997 Nov 15;25(22):4692-3. doi: 10.1093/nar/25.22.4692. PMID: 9358185; PMCID: PMC147078
- Allan, G. J.; Max, T. L. *Molecular Genetic Techniques and Markers for Ecological Research*. 2010, Nature Education 3(10):2
- Allendorf, Fred & Luikart, Gordon. (2006). *Conservation and genetics of populations*. Blackwell Publishing.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Atig RK, Hsouna S, Beraud-Colomb E, Abdelhak S. ADN mitochondrial: propriétés et applications [Mitochondrial DNA: properties and applications]. *Arch Inst Pasteur Tunis*. 2009;86(1-4):3-14. French. PMID: 20707216.
- Avice, J.C. (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge. <https://doi.org/10.2307/j.ctv1nzfgj7>
- Baer CF, Miyamoto MM, Denver DR. Mutation rate variation in multicellular eukaryotes: causes and consequences. *Nat Rev Genet.* 2007 Aug;8(8):619-31. doi: 10.1038/nrg2158. PMID: 17637734.
- Ballard JW, Whitlock MC. The incomplete natural history of mitochondria. *Mol Ecol.* 2004 Apr;13(4):729-44. doi: 10.1046/j.1365-294x.2003.02063.x. PMID: 15012752.
- Barrett RD, Schluter D. Adaptation from standing genetic variation. *Trends Ecol Evol.* 2008 Jan;23(1):38-44. doi: 10.1016/j.tree.2007.09.008. Epub 2007 Nov 14. PMID: 18006185.
- Beaman, M.; Madge, S. *The Handbook of Bird Identification for Europe and the Western Palearctic*. 1998. ISBN: 0713639601

- Boopathi, N. M. Genetic Mapping and Marker Assisted Selection: Basics, Practice and Benefits. ResearchGate, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-0958-4>
- Castresana J., Cytochrome b Phylogeny and the Taxonomy of Great Apes and Mammals, *Molecular Biology and Evolution*, Volume 18, Issue 4, April 2001, Pages 465–471, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003825>
- Charlesworth B. Fundamental concepts in genetics: effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nat Rev Genet.* 2009 Mar;10(3):195-205. doi: 10.1038/nrg2526. PMID: 19204717.
- Chial, H.; Craig, J. mtDNA and Mitochondrial Diseases. 2008, *Nature Education* 1(1):217
- Dan Graur, An Upper Limit on the Functional Fraction of the Human Genome, *Genome Biology and Evolution*, Volume 9, Issue 7, July 2017, Pages 1880–1885, <https://doi.org/10.1093/gbe/evx121>
- Duriez, Olivier & Ferrand, Yves & Corda, Eve & Gossmann, François & Fritz, Hervé. (2005). Habitat selection of the Eurasian woodcock in winter in relation to earthworms availability. *Biological Conservation*. 122. 479-490. 10.1016/j.biocon.2004.08.011.
- F. W. Allendorf, G. Luikart and S. N. Aitken, “Conservation and the Genetics of Populations,” 2nd Edition, Wiley-Blackwell, Hoboken, 2012.
- Ferrand, Yves & Aubry, Philippe & Gossmann, François & Bastat, Claudine & Guénézan, Michel. (2006). Monitoring of the european woodcock populations, with special reference to France.
- Ferrand, Y.; Gossmann, F. Elements for a Woodcock (*Scolopax rusticola*) management plan. *Game Wildl. Sci.* 2001, 18, 115–139
- Fish, J., et al. Discovery of a Major D-Loop Replication Origin Reveals Two Modes of Human mtDNA Synthesis. *Science* 306, 2098-2101, 2004. <https://doi.org/10.1126/science.1102077>
- Funk, W. Chris & Forester, Brenna & Converse, Sarah J & Darst, Catherine & Morey, Steve. (2019). Improving conservation policy with genomics: a guide to integrating adaptive potential into U.S. Endangered Species Act decisions for conservation practitioners and geneticists. *Conservation Genetics*. 20. 1-20. 10.1007/s10592-018-1096-1.

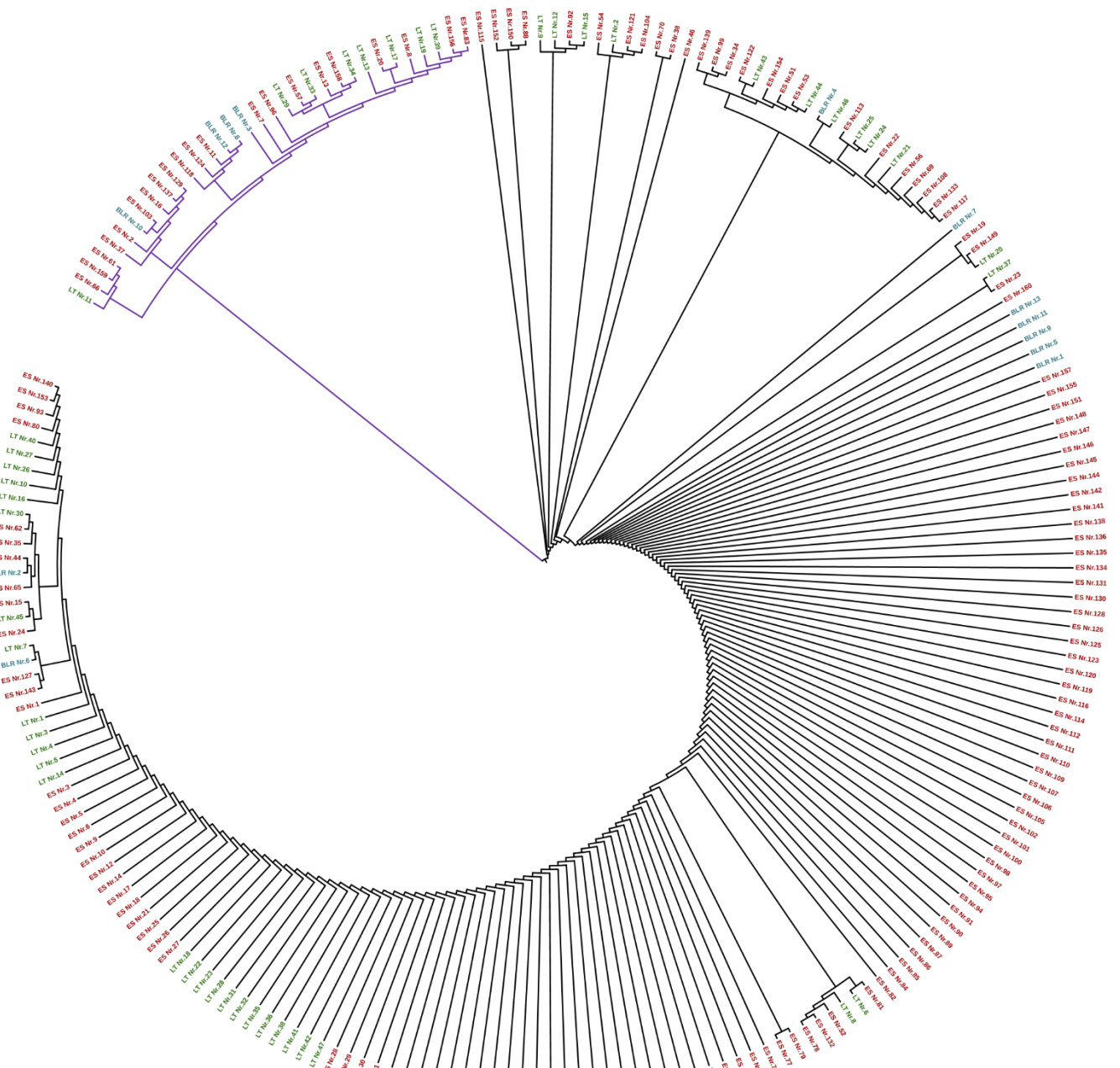
- Galtier N, Nabholz B, Glémin S, Hurst GD. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol Ecol*. 2009 Nov;18(22):4541-50. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x. Epub 2009 Oct 9. PMID: 19821901.
- Gianluca Lombardo, Nicola Rambaldi Migliore, Giulia Colombo, Marco Rosario Capodiferro, Giulio Formenti, Manuela Caprioli, Elisabetta Moroni, Leonardo Caporali, Hovirag Lancioni, Simona Secomandi, Guido Roberto Gallo, Alessandra Costanzo, Andrea Romano, Maria Garofalo, Cristina Cereda, Valerio Carelli, Lauren Gillespie, Yang Liu, Yosef Kiat, Alfonso Marzal, Cosme López-Calderón, Javier Balbontín, Timothy A. Mousseau, Piotr Matyjasiak, Anders Pape Møller, Ornella Semino, Roberto Ambrosini, Andrea Bonisoli-Alquati, Diego Rubolini, Luca Ferretti, Alessandro Achilli, Luca Gianfranceschi, Anna Olivieri, Antonio Torroni, The Mitogenome Relationships and Phylogeography of Barn Swallows (*Hirundo rustica*), *Molecular Biology and Evolution*, Volume 39, Issue 6, June 2022, msac113, <https://doi.org/10.1093/molbev/msac113>
- Hartl, Daniel L, and Andrew G Clark. *Principles of Population Genetics*. 4th ed. Sunderland, Mass: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2007. Print.
- Hohenlohe PA, Funk WC, Rajora OP. Population genomics for wildlife conservation and management. *Mol Ecol*. 2021 Jan;30(1):62-82. doi: 10.1111/mec.15720. Epub 2020 Nov 18. PMID: 33145846; PMCID: PMC7894518.
- Hoyo, J. D.; Elliott, A.; Sargatal, J.; Bateman, R. *Handbook of the Birds of the World*, Volume 3. 1996, Lynx Edition. ISBN: 8487334202
- HOODLESS, A.N. and HIRONS, G.J.M. (2007), Habitat selection and foraging behaviour of breeding Eurasian Woodcock *Scolopax rusticola*: a comparison between contrasting landscapes. *Ibis*, 149: 234-249. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2007.00725.x>
- Hundertmark, K.J., Van Daele, L.J. Founder effect and bottleneck signatures in an introduced, insular population of elk. *Conserv Genet* 11, 139–147 (2010). <https://doi.org/10.1007/s10592-009-0013-z>
- Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol*. 2006 Feb;23(2):254-67. doi: 10.1093/molbev/msj030. Epub 2005 Oct 12. PMID: 16221896.

- Johns GC, Avise JC. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Mol Biol Evol.* 1998 Nov;15(11):1481-90. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025875. PMID: 12572611.
- Jombart, T., Devillard, S. & Balloux, F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet* 11, 94 (2010). <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>
- Jusys, V.; Karalius, S.; Raudonikis, L. “Pažinkime Lietuvos paukščius”, 2022 Vilnius, Lietuvos ornitologų draugija
- K.K. Kanaka, Nidhi Sukhija, Rangasai Chandra Goli, Sanjeev Singh, Indrajit Ganguly, S.P. Dixit, Aishwarya Dash, Anoop Anand Malik, On the concepts and measures of diversity in the genomics era, *Current Plant Biology*, Volume 33, 2023, 100278, ISSN 2214-6628, <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2023.100278>.
- Kirby LT. 1990. DNA Fingerprinting: An Introduction. M. Stockton Press, New York. DOI: 10.1007/978-1-349-12040-6
- Linacre A. Capillary electrophoresis of mtDNA cytochrome b gene sequences for animal species identification. *Methods Mol Biol.* 2012;830:321-9. doi: 10.1007/978-1-61779-461-2_22. PMID: 22139670.
- Lynch, Michael & Ackerman, Matthew & Gout, Jean-Francois & Long, Hongan & Sung, Way & Thomas, William & Foster, Patricia. (2016). Genetic drift, selection and the evolution of the mutation rate. *Nature Reviews Genetics*. 17. 704-714. 10.1038/nrg.2016.104.
- Martin, G.R. Visual fields in woodcocks *Scolopax rusticola* (Scolopacidae; Charadriiformes). *J Comp Physiol A* 174, 787–793 (1994). <https://doi.org/10.1007/BF00192728>
- Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010 Jan;11(1):31-46. doi: 10.1038/nrg2626. Epub 2009 Dec 8. PMID: 19997069.
- Montgomery Slatkin, Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. *Science* 236, 787-792 (1987). DOI: 10.1126/science.3576198
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000 Jun;155(2):945-59. doi: 10.1093/genetics/155.2.945. PMID: 10835412; PMCID: PMC1461096.

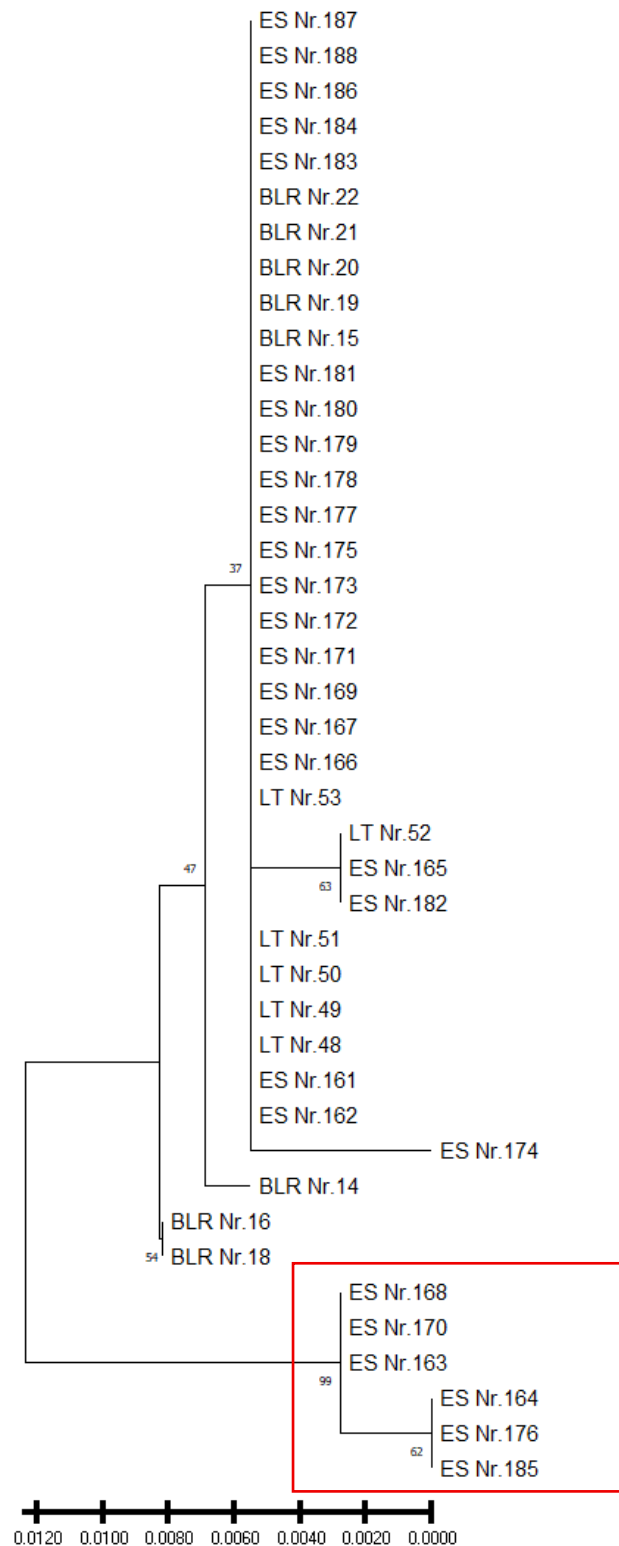
- SEEB, J.E., CARVALHO, G., HAUSER, L., NAISH, K., ROBERTS, S. and SEEB, L.W. (2011), Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in nonmodel organisms. *Molecular Ecology Resources*, 11: 1-8. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02979.x>
- Selkoe KA, Toonen RJ. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett.* 2006 May;9(5):615-29. doi: 10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x. PMID: 16643306.
- Stange, M., Barrett, R.D.H. & Hendry, A.P. The importance of genomic variation for biodiversity, ecosystems and people. *Nat Rev Genet* 22, 89–105, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-00288-7>
- Stewart JB, Chinnery PF. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat Rev Genet.* 2015 Sep;16(9):530-42. doi: 10.1038/nrg3966. PMID: 26281784.
- Trucchi, E., et al. A genetic characterization of European Woodcock (*Scolopax rusticola*, Charadriidae, Charadriiformes) overwintering in Italy. *Italian Journal of Zoology*, 2011. 78. 146-156. 10.1080/11250003.2010.547877
- Tucker, G. M.; Heath, M. F. Birds in Europe: Their Conservation Status. Birdlife Conservation Series no. 3. 1995, Cambridge. 270–271. ISBN: 1560985275
- Wan, Q.-H., Wu, H., Fujihara, T. and Fang, S.-G. (2004), Which genetic marker for which conservation genetics issue?. *ELECTROPHORESIS*, 25: 2165-2176. <https://doi.org/10.1002/elps.200305922>
- Whitlock, M., McCauley, D. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \approx 1/(4Nm+1)$. *Heredity* 82, 117–125 (1999). <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6884960>
- Zhang, Jisen & Zhang, Xingtian & Tang, Haibao & Zhang, Qing & Hua, Xiuting & Ma, Xiaokai & Zhu, Fan & Jones, Tyler & Zhu, Xinguang & Bowers, John & Wai, Ching & Zheng, Chunfang & Shi, Yan & Chen, Shuai & Xu, Xiuming & Yue, Jingjing & Nelson, David & Huang, Lixian & Li, Zhen & Ming, Ray. (2018). Allele-defined genome of the autopolyploid sugarcane *Saccharum spontaneum* L. *Nature Genetics*. 50. 10.1038/s41588-018-0237-2.

Zhao L, Pridgeon JW, Becnel JJ, Clark GG, Linthicum KJ. Mitochondrial gene cytochrome b developmental and environmental expression in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2009 Nov;46(6):1361-9. doi: 10.1603/033.046.0615. PMID: 19960681.

Priedai



1 priedas. Sukonstruotas filogenetinis medis pagal MEGA programa sulygintas sekas, vizualiai apdorotas iTOL svetainėje (Sco1L/Sco1R pradmenų pora). Violetine spalva paryškintos DNR sekos, kurios priklauso haplogrupei B. Prie kiekvienos sekos nurodytos vietovės, iš kurių buvo gauti mėginiai. Raudona spalva žymi Ispaniją, žalia – Lietuvą, mėlyna – Baltarusiją.



2 priedas. Sukonstruotas filogenetinis medis pagal MEGA programa sulygintas sekas (ScoUL/ScoUR pradmenų pora). Raudoname stačiakampy pažymėtos DNR sekos, kurios priklauso haplogrupei B. ES – Ispanija, LT – Lietuva, BLR – Baltarusija.

3 priedas. Haplotipų lentelė (Sco1L/Sco1R pradmenų pora). Hap_A ir Hap_B nurodo haplogrupes, Hap_Nr – haplotipų skaičių. N nurodo individų skaičių, priskirtinų haplotipams. Virš referentinės (pirmosios) sekos esantis skaičius nurodo nukleotido poziciją sekoje, kurioje yra įvykusi mutacija. Vietovės parašytos sutrumpintai: LT – Lietuva, ES – Ispanija, BLR – Baltarusija.